



TITLE:

ヘルパーT細胞の認識する腫瘍抗原  
ペプチドの機能解析(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

清水, 健之

---

CITATION:

清水, 健之. ヘルパーT細胞の認識する腫瘍抗原ペプチドの機能解析. 京都大学, 1995, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1995-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3099635>

RIGHT:

学位申請論文

ヘルパーT細胞の認識する腫瘍抗原ペプチドの機能解析

清水健之

## 論文要旨

マウスフレンドウィルスによって誘発される腫瘍細胞の拒絶には、ヘルパーT細胞(Th)の重要性が示されている。現在までにフレンドウィルスによって誘発された腫瘍細胞FBL-3を特異的に認識し、増殖するCD4<sup>+</sup>のT細胞クローン4株が確立されていた。今回これらのT細胞クローンに認識される抗原ペプチドを組換えワクシニアウィルスと合成ペプチドを用いて決定した。その結果、これらの4クローンはすべてF-MuLVのenv遺伝子の一部を認識し、2クローンはenv<sub>122-141</sub>を、別の1クローンはenv<sub>462-479</sub>ペプチドを認識することを示した。前者のペプチドを用いてマウスを免疫したところ、新たに5クローンのThを得た。さらにこのペプチドのT細胞による認識を詳しく解析した。Thの増殖活性は13残基に短縮したペプチド

(env<sub>125-137</sub>)でも見られ、このなかに活性に必須なアミノ酸は含まれているが、十分高い活性を得るには、20残基程度の長さが必要であることを示した。また、各アミノ酸残基をアラニンに置換し、その活性をはかることにより、代表的なThクローンでは、5残基が活性に必要であり、そのうち2残基がMHCとの結合に、3残基がT細胞抗原受容体(TCR)による認識に必要であることを示した。また、活性の低い13残基のペプチドを8分子共有結合させると活性の上昇がみられ、MAPペプチドによるTh誘導の可能性を示した。これらの長さの異なるペプチドやアラニン置換ペプチドに対する反応性はThクローンによって異なり、TCRによるペプチド認識の柔軟性が示唆された。

## 目次

序論	1
材料と方法	
1. マウス	4
2. 腫瘍細胞	4
3. FBL-3特異的Th細胞株	4
4. rVVの作製とこれを発現する細胞	4
5. ペプチドの合成	7
6. Thクローンの増殖測定	7
7. ペプチドによるThクローンの誘導	7
8. 競合阻害実験	8
9. 抗体	8
実験結果	
1. rVVによるThクローンの抗原ペプチドの存在位置の決定	9
2. M-MuLVによって誘発された腫瘍に対するThクローンの反応性	12
3. 合成ペプチドを用いたSB14-31、BL4L-23の抗原ペプチドの決定	14
4. 合成ペプチドを用いたF5-5の抗原ペプチドの決定	16
5. $f_{n20}$ ペプチドを用いた免疫によるThクローンの単離	19
6. ペプチドの長さとの活性の変化	21
7. アラニン置換による活性に必要なアミノ酸残基の決定	30
8. MHC、TCRに結合しているアミノ酸残基の決定	41
9. MAPペプチドの活性	43
考察	
1. FBL-3特異的Thクローンの抗原ペプチドの決定	47
2. ペプチド免疫によるThクローンの確立	47
3. $f_{n20}$ ペプチドの各アミノ酸残基の機能	48
4. 同一のペプチドを認識する複数のThクローン（ペプチドの長さについて）	50
5. 同一のペプチドを認識する複数のThクローン（アラニン置換ペプチドについて）	51
6. MAPによる活性の増強	51
7. まとめ	52
謝辞	54
参考文献	55

免疫系は、外界からの異物や腫瘍細胞の排除を行う。多様な抗原を特異的に認識する抗原受容体は、遺伝子再配列という特異な方法でその多様性を獲得している。免疫グロブリンとT細胞抗原受容体 (T cell receptor: TCR) の遺伝子は、V(D)J遺伝子断片の特徴的なシグナルを用いた組換えによって完成され、その用いる遺伝子断片レパートリーの組み合わせと、ランダムな塩基の挿入と欠失を含む組換え結合部位によって多くの多様性を得ることができるのである (Tonegawa, 1983)。これらの再配列は、その副産物として染色体外に環状DNAを生じさせる組換えであり

(Fujimoto and Yamagishi, 1987)、このような環状DNAの解析によって免疫グロブリンの軽鎖 $\kappa$ 鎖定常領域の削除 (Shimizu et al., 1991: 参考論文1) や、重鎖組換えの特徴について解析を行った (Shimizu and Yamagishi, 1992: 参考論文3)。核内に存在する染色体外小環状DNAは、発生 (Yamagishi et al., 1983)、分化 (Toda and Yamagishi, 1984、Iwasato et al., 1993: 参考論文6)、老化 (Kunisada et al., 1985)、腫瘍化 (Yamagishi et al., 1984) にともないその量や長さに変化が見られるが、免疫系細胞では遺伝子再配列 (V(D)J組換え、及びクラススイッチ組換え (Iwasato et al., 1990)) をよく反映しており、それらの解析におおいに役に立った (清水, 1993: 参考論文8)。また、遺伝子再配列はリンパ球細胞の分化によって制御されているが、組換えに先行して起こる転写がその制御に関係していることが示唆されている (Shimizu et al., 1993a: 参考論文4)。さらにTCRの組換えを利用することにより、X線によって誘発されるリンパ種の腫瘍化と、それが起こるT細胞の分化段階について解析した (Kubo et al., 1992: 参考論文2、Shimizu et al., 1993b: 参考論文7)。

このようにして多様性を獲得した抗原受容体がどのようにして抗原を認識し、さらに活性化されて免疫効果をもたらすのだろうか。そこでウイルス誘発腫瘍細胞特異的T細胞による抗原ペプチド認識様式について解析した。

ウイルス感染や腫瘍細胞から生体を防御するために、T細胞による細胞性免疫が重要な役割を果たす。ウイルス感染細胞や腫瘍細胞を直接攻撃する細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) がこれらの防御に重要であることは当然であるが、インターロイキン2やインターフェロン $\gamma$ を産生することにより免疫機能を高めるヘルパーT細胞 (Th) の働きを忘れることはできない。

T細胞は抗原提示細胞 (antigen presenting cell: APC) 上の主要組織適合複合体



(major histocompatibility complex: MHC) 分子に結合した抗原ペプチドをTCRによって特異的に認識する。CTLはクラスI型、ThはクラスII型MHCに結合したペプチドを認識する。この認識が成立するとT細胞は活性化され、その役割を発揮する。いくつかのクラスI型 (Saper et al., 1991、Madden et al., 1992)、クラスII型 (Brown et al., 1993) MHC分子についてその立体構造が解析され、またそれに結合する抗原ペプチドの配列についての研究が進んでいる (Rudensky et al., 1991、Engelhard, 1994)。またMHC-抗原ペプチド複合体の立体構造についての解析も行われた (Fremont et al., 1992、Zhang et al., 1992、Stern et al., 1994)。しかし依然として抗原ペプチドのMHC結合やTCRによるMHC-抗原ペプチド複合体の認識様式は未知の部分が多い。これを解析することは、ウィルス感染や腫瘍に対するペプチドによるワクチンの開発の可能性を考える上で意義がある。

フレンド白血病ウィルス複合体 (FV) は、複製欠損で急性形質転換能を持つ脾限局巣形成ウィルス (spleen focus-forming virus: SFFV) とヘルパーウィルスとしてのフレンド白血病ウィルス (Friend murine leukemia virus: F-MuLV) からなるレトロウィルスで、感受性のマウスに接種すると重篤な免疫不全と急性赤白血病を引き起こす。赤芽球前駆細胞のポリクローナルな増殖は、SFFVのenv遺伝子によってコードされたgp55によって誘導される (Aizawa et al., 1990、Li et al., 1990)。その後、ウィルスのLTRの染色体への組み込みにより、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化が起こり、モノクローナルな赤白血病が生じる (Ikawa et al., 1992)。FVに対する感受性は、宿主のMHC遺伝子型に依存しており、クラスI型ではD<sup>b</sup>、II型ではI-A<sup>b</sup>を持つときに抵抗性が高い (Chesebro et al., 1990)。特にI-A<sup>b</sup>の影響の強さが示されていることから (Morrison et al., 1987、Miyazawa et al., 1988)、Thの重要性が強調されている。CTLは白血病からの回復に、Thはその状態の維持に重要であると考えられている (Robertson et al., 1992)。

FVによってC57BL6 (B6) マウス (H-2<sup>b</sup>) に誘発された腫瘍細胞FBL-3はH-2<sup>b</sup>を持つマウスに移植するといった腫瘍塊を形成した後、宿主の免疫機能により排除される。このようにして免疫されたマウスから、FBL-3を特異的に認識して増殖するT細胞クローンが樹立された (Matsubayashi et al., 1990、Hirama et al., 1991)。そのうちの多くはCD8<sup>+</sup>のCTLであり、CD4<sup>+</sup>を示すThクローンは4株 (SB14-31、BL4L-23、BL4L-30、F5-5) のみ分離されている (Iwashiro et al., 1993: 参考論文5)。これらのThクローンは、それぞれその由来するマウスの脾臓細胞をAPCとして要求

する (Iwashiro et al., 1993)。また、これらのT細胞クローンは、抗腫瘍効果を持つ。すなわち、T細胞を欠くB6ヌードマウスにFBL-3を移植すると拒絶は起こらないが、ここにCTLもしくはThクローンを移植すると腫瘍の拒絶が起こる (栗林ら、未発表結果)。

今回、これら4株のThクローンについてその抗原となるペプチドの同定を試みた。組換えワクシニアウイルス (recombinant Vaccinia Viurs: rVV) を用いて抗原領域をF-MuLVのenvの特定領域にしぼり、合成ペプチドを用いて抗原ペプチドを決定した。Thのうち2株はクラスII型 MHC I-A<sup>b</sup>に結合したenvのN端付近の20残基のペプチドを、1株はI-E<sup>b/d</sup>に結合したC端付近の18残基のペプチドを認識する

(Iwashiro et al., 1993)。これらのペプチドはFBL-3と同程度のTh増殖活性を持つ。さらにこれらのペプチドは、FV感染防御免疫を誘導することができた (Miyazawa et al., 論文投稿中)。

このことから、これらのペプチドは効率良くThを誘導できると考え、前者のペプチドでマウスを免疫したところ、5つのThクローンをえることができた (Shimizu et al., 1994)。

このペプチドはI-A<sup>b</sup>に結合するペプチドに多く見られるモチーフ構造 (xxNxxxxxPxxxx) (Rudensky et al., 1992) を持っていなかった。そこでこのペプチドについて各アミノ酸残基の機能について詳しく解析した。ペプチドの短縮と各アミノ酸残基のアラニン置換を行い、MHCへの結合に必要な残基とTCRによって認識される残基を決定した (Shimizu et al., 1994)。またこのペプチドを8分子共有結合させることにより活性の増強が見られた。

Thクローンの確立の難しさから、これまでに行われているクラスII型MHCに結合するペプチドの解析の多くは、Thハイブリドーマを用いている (Allen et al., 1987, Gautam et al., 1992, Jorgensen et al., 1992, Williams et al., 1993)。今回、ひとつの抗原ペプチドが複数のThクローンによって異なる反応性を持って認識されることを示した (Shimizu et al., 1994)。

## 材料と方法

### 1. マウス

京都大学医学部動物実験施設にて維持されているC57BL6 (B6) (H-2<sup>b</sup>)、BALB/c (H-2<sup>d</sup>) およびそのF<sub>1</sub>マウスCB6F<sub>1</sub>、雄雌とも8から12週齢を使用した。

### 2. 腫瘍細胞

フレンドウィルスで誘発された腫瘍細胞FBL-3およびモロニー白血病ウィルス (Moloney murine leukemia virus: M-MuLV) で誘発された腫瘍細胞MBL-2はB6マウスに腹水型で継代した (Matsubayashi et al., 1990)。腫瘍細胞FT-5は、京都大学医学部免疫研究施設において、新生仔B6マウスにFVを接種することにより確立された。これらの腫瘍細胞は、in vitroで10%牛胎仔血清を加えたRPMI1640培地中で培養した (Iwashiro et al., 1993)。

### 3. FBL-3特異的Th細胞株

FBL-3特異的Thクローンは、FBL-3で免疫したB6 (クローンSB14-31、BL4L-23、BL4L-30) もしくはCB6F<sub>1</sub> (クローンF5-5) マウスの脾臓細胞を、放射線照射により不活性化したFBL-3とともに培養し、限界希釈によりクローニングした (Iwashiro et al., 1993)。これらのThクローンは、in vitroでは放射線で不活性化したFBL-3細胞 (100Gy) とAPCとしての同系マウスの脾臓細胞 (20Gy) とともに human recombinant IL-2存在下で継代した。Thクローンの維持に用いた完全培地は、10%牛胎仔血清、5x10<sup>-5</sup>M 2-メルカプトエタノール、100U/mlペニシリン、100μg/ml ストレプトマイシンを含むRPMI1640 (日水) である。

### 4. rVVの作製とこれを発現する細胞

ワクシニアウィルス発現ベクターpSC11-SS (Chakrabarti et al., 1985、Iwashiro et al., 1993) にF-MuLVの *gag*、*env*、および *env* の一部分を組み込んだ (図1)。これ



らのrVVをマウスH-2D<sup>b</sup>を導入したFisherラット胎児由来繊維芽細胞B-2 (Ruan and Lilly, 1991) に感染させた (Iwashiro et al., 1993)。細胞株Df45は、B-2にSFFVとF-MuLVの両者を感染させたものである (Ruan and Lilly, 1991)。

# F-MuLV

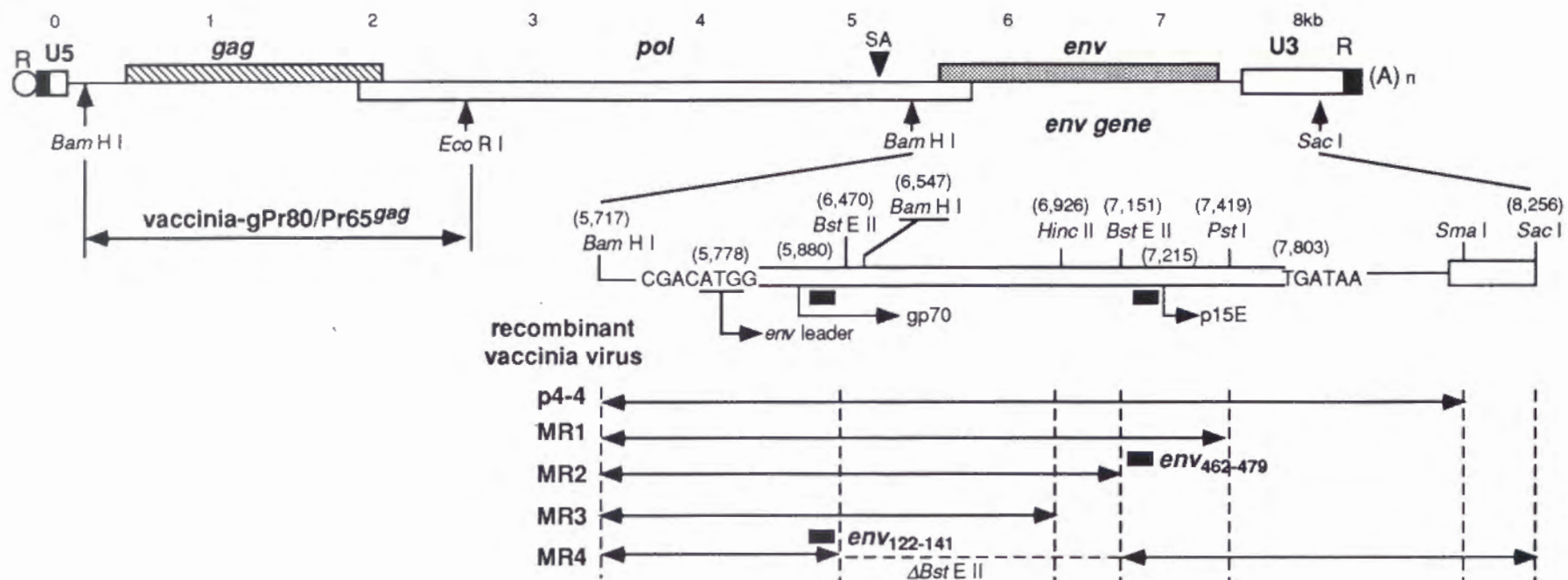


図1 F-MuLVの遺伝子構造と作製したF-MuLV *env*組換えワクシニアウイルス

◀▶で示された遺伝子断片を含むを含むrVV (p4-4、MR-1、MR-2、MR-3、MR-4) は、図中の制限酵素部位を用いて作製された。

■は、本研究によって決定されたThによって認識されるペプチドの位置  
SA: splicing acceptor site

## 5. ペプチドの合成

すべてのペプチドは、WangレジンにC端から合成を進める9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)固相法 (Dryland and Sheppard, 1986) によって合成した。合成には、ACT350 型 multiple peptide synthesizer (Advanced Chem Tech社) もしくは 430A peptide synthesizer (Applied Biosystem社) を用いた。MAPペプチドの合成は、手動で行った。用いた側鎖の保護されたアミノ酸は、Asn(Trt)、Asp(O<sup>t</sup>Bu)、Arg(Pmc)、Cys(Trt)、Gln(Trt)、Glu(O<sup>t</sup>Bu)、His(Trt)、Lys(Boc)、Ser(<sup>t</sup>Bu)、Thr(<sup>t</sup>Bu)、Tyr(<sup>t</sup>Bu)、Lys(Fmoc)(MAPペプチドのC端側のみ)である。

側鎖の保護基、N端のFmoc基の脱保護及びレジンからの切断は、trifluoroacetic acid- thioanisole- *m*-cresol- ethanedithiol- H<sub>2</sub>O (80:5:5:5:5, vol/vol)にて室温で2から2.5時間反応させて行った。脱保護されたペプチドをエーテルで沈殿させ、遠心で集めた、さらにエーテルで3回沈殿を洗った。得られたペプチドを1規定の酢酸に溶かし、C18逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーを用いて、H<sub>2</sub>O / 0.1% trifluoroacetic acidに対するアセトニトリルの濃度勾配によって精製した。

## 6. Thクローンの増殖測定

放射線照射 (20Gy) したマウス脾臓細胞 ( $5 \times 10^5$ ) をAPCとして用い、放射線照射 (100Gy) した  $1 \times 10^4$  の腫瘍細胞、rVV感染B-2細胞もしくは合成ペプチドを  $1 \times 10^5$  のThクローンとともに200 $\mu$ lの完全培地で37℃48時間培養する。18.5kBqの [<sup>3</sup>H] thymidineを加え4時間培養した後、細胞をガラスフィルター上に回収して、液体シンチレーションカウンターで [<sup>3</sup>H] thymidineの取り込みを測定した。それぞれ200 $\mu$ lの培養を3ヶずつ行い、その平均値と標準偏差を図及びグラフに示した (Shimizu et al., 1994)。

## 7. ペプチドによるThクローンの誘導

合成ペプチド10もしくは100 $\mu$ gを100 $\mu$ lの生理食塩水に溶かし、完全フロイントアジュバントと1:1に混合してエマルジョンにし、B6マウスの皮下数ヵ所に投与した。

10日後にリンパ節からリンパ球を採り、ナイロンウールカラムを通してT細胞を濃縮した。 $4 \times 10^6$ のT細胞を、APCとして $2 \times 10^6$ の放射線照射（20Gy）したB6マウスの脾臓細胞及び、合成ペプチド0.5もしくは $5 \mu\text{g/ml}$ 存在下で7日間 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ にて培養し、増殖するものを選択した。さらにAPC、ペプチド、human recombinant IL-2存在下で限界希釈を行い、クローン化した。得られたクローンのCD4の発現をフローサイトメトリーで調べ、すべてのCD4陽性クローンについてペプチドに対する特異性を有しているかを調べた。特異的クローンについて、さらにもう一度限界希釈によるクローニングを行った。

## 8. 競合阻害実験

APCとして $2 \times 10^6$ の放射線照射した脾臓細胞と $0.2 \mu\text{g/ml}$  ( $0.08 \mu\text{M}$ ) の $f_{n20}$ ペプチド存在下で、 $4 \times 10^6$ のSB14-31を6と同じ条件で培養した。そのとき、活性が無いペプチド $0.215 \sim 5.81 \mu\text{M}$ を競合阻害剤として加えて、その効果を調べた。

## 9. 抗体

用いたモノクローナル抗体は、抗CD4（GK1.5）、抗CD8（anti-Ly-2.2）（Matis et al., 1986）、抗I-E $\alpha$ （14-4-4S）、抗I-A $\beta$ （25-9-17S）（American Type Culture Collection (Rockville Md.)) である。

## 実験結果

### 1. rVVによるThクローンの抗原ペプチドの存在位置の決定

F-MuLVの遺伝子断片を持つrVVを感染させたB2細胞と、APCとしての同系マウスの脾臓細胞をともに放射線照射により不活性化し、その存在下でFBL-3特異的Thクローンの増殖を測定した（図2）。F-MuLV *env* 領域を持つrVV感染細胞はThを刺激し増殖に導いたが、F-MuLV *gag* またはSFFV *env* では増殖は見られなかった。このことよりFBL-3特異的Thの認識する抗原ペプチドはF-MuLV *env* 領域にあることがわかった。さらに図1に示すようなF-MuLVの *env* 遺伝子の断片を持つrVVを用いて同様な実験を行った（表1）。B6マウスに由来する3つのThクローンはrVV MR3に反応し、抗原ペプチドはgp70 *env* のN端付近にあることがわかった。さらに2クローンSB14-31、BL4L-23についてはrVV MR4に弱く反応した（表1）。このことはこの2クローンの抗原ペプチドは、6470番の *Bst*EII 部位よりN端側にあることを意味する。またBL4L-30はMR-4に非常に弱く反応しただけだったので、このクローンによって認識される抗原ペプチドとは異なることが示唆された。CB6F<sub>1</sub>マウス由来のThクローンF5-5は、MR1にのみ反応し（表1）、他のクローンとは違う *env* 領域のC端付近にある抗原ペプチドを認識することがわかった。



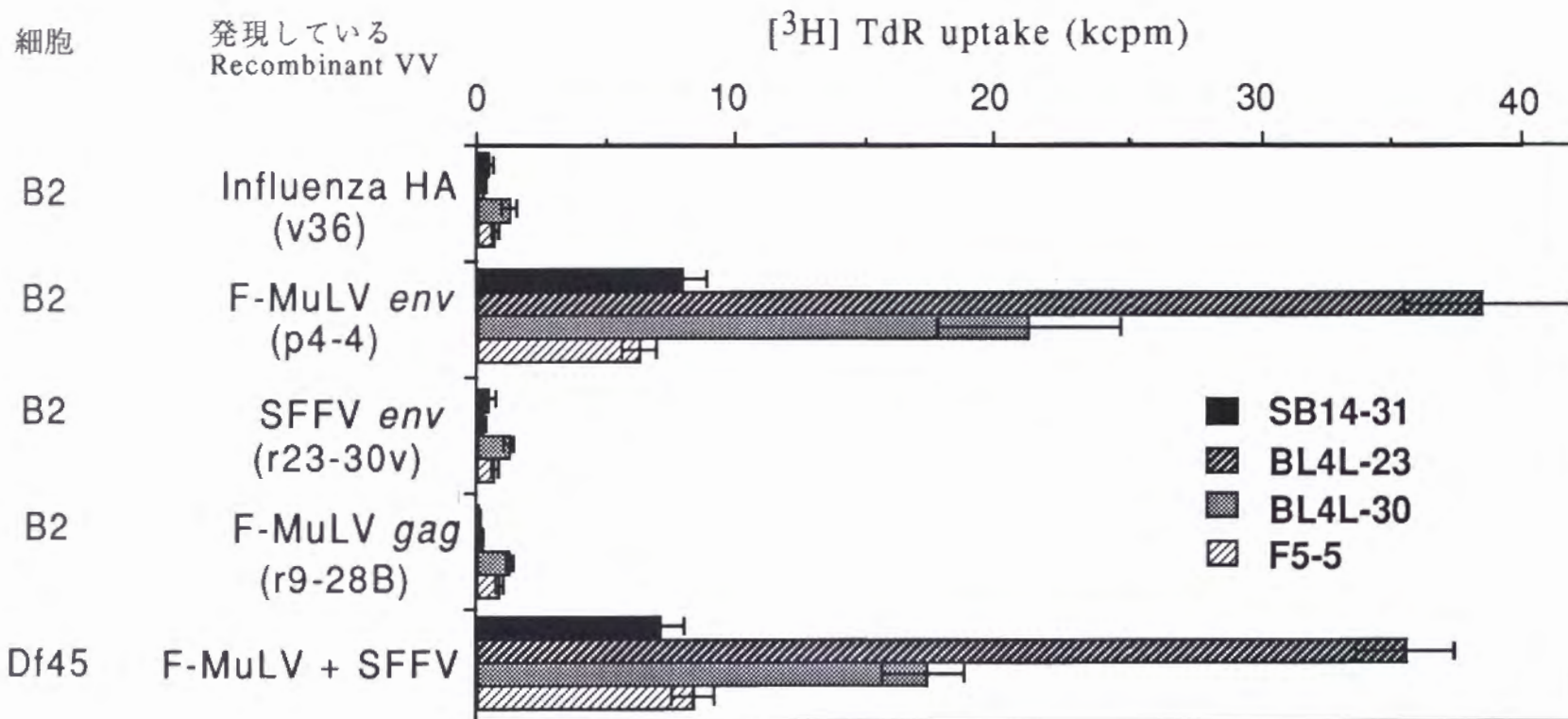


図2 組換えワクシニアウイルスによるThの増殖

同系マウスの脾臓細胞をAPCとして用いて、F-MuLV *env*、*gag*、SFFV *env*を含むrVVを感染させた細胞によってThが活性化され増殖するかを $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みをみることにより測定した。

Influenza HAを含むrVV V36は、ネガティブコントロールとして用いた。  
Df45 (SFFV、F-MuLVを発現している) は、ポジティブコントロールとして用いた。  
3回の実験のうちの一例を示す。

刺激細胞	発現しているrVV	反応細胞			
		SB14-31	BL4L-23	BL4L-30	F5-5
培地のみ		53±18	304±118	85±44	62±26
APCのみ		197±17	373±54	307±176	980±115
APC +FBL-3		5,499±2,153	32,701±471	2,250±89	2,748±581
APC +B2	VV-influenza hemagglutinin	170±25	480±31	238±47	266±130
APC +B2	p4-4 (F-MuLV <i>env</i> )	<b>44,113±1,306</b>	<b>60,621±3,118</b>	<b>17,574±1,384</b>	<b>10,161±282</b>
APC +B2	MR1 ( <i>Bam</i> HI- <i>Rst</i> I)	<b>38,668±972</b>	<b>42,918±9,116</b>	<b>19,653±2,964</b>	<b>11,603±2,100</b>
APC +B2	MR2 ( <i>Bam</i> HI- <i>Bst</i> EII)	<b>39,179±2,203</b>	<b>35,697±987</b>	<b>20,759±938</b>	156±16
APC +B2	MR3 ( <i>Bam</i> HI- <i>Hinc</i> II)	<b>28,395±3,558</b>	<b>20,029±3,469</b>	<b>21,466±3,365</b>	124±29
APC +B2	MR4 ( $\Delta$ <i>Bst</i> EII)	<b>3,616±926</b>	<b>1,461±289</b>	<b>540±120</b>	365±185

表1 F-MuLV *env*の一部を持つrVVによるThの増殖

同系マウスの脾細胞をAPCとして用いて、F-MuLVの一部を含むrVVを感染させた細胞によってThが活性化され増殖するかを<sup>3</sup>H]thymidineの取り込みをみることにより測定した。(値は、cpm±標準偏差)

Influenza HAを含むrVV V36は、ネガティブコントロールとして用いた。  
ネガティブコントロールに対して、有意に活性が高いものを太字で示す。  
6回の実験のうちの一例を示す。

## 2. M-MuLVによって誘発された腫瘍に対するThクローンの反応性

F-MuLVはM-MuLVと相同性がある。そこでこれらのThクローンがFVだけでなくM-MuLVで誘導された腫瘍細胞をも認識できるかを調べた。2クローンSB14-31、BL4L-23はFVで誘導されたFT-5とM-MuLVで誘導されたMBL-2に、FBL-3に対してよりも強く反応した(図3)。よってこれらのThクローンは、F-MuLVとM-MuLVの間で相同性の高い部分のペプチドを認識していることが示唆された。しかし、その他の2クローンBL4L-30、F5-5はMBL-2に対して有意な反応性を示さなかった(図3)。このことからBL4L-30がSB14-31、BL4L-23とは異なるペプチドを認識していることがわかる。

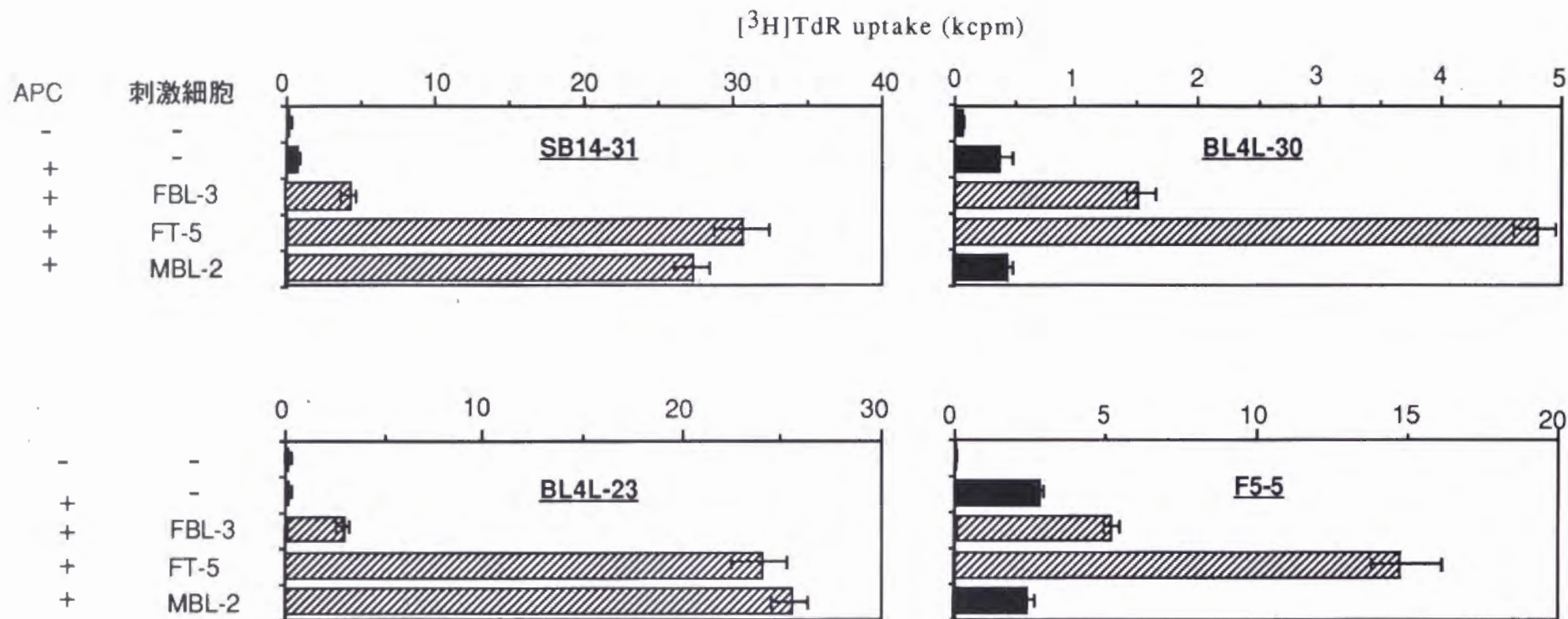


図3 F-MuLVもしくはM-MuLVによって誘発された腫瘍細胞によるThの増殖

腫瘍細胞によるThの増殖を[<sup>3</sup>H]thymidineの取り込みをみることにより測定した。  
 APCとして、同型マウスの脾臓細胞を用いた。  
 FBL-3とFT-5はFV、MBL-2はM-MuLVによって誘発された腫瘍細胞。  
 4回の実験のうちの一例を示す。

### 3. 合成ペプチドを用いたSB14-31、BL4L-23の抗原ペプチドの決定

さらにこれらのThによって認識される抗原ペプチドを決定するため、F-MuLVの *env* のrVVに含まれる領域内の20残基程度のペプチドを合成し、そのThの増殖活性を調べた。Margalitら（1987）によると、Thに認識されるペプチドは片側に極性アミノ酸を持ち、反対側に非極性アミノ酸を持つ両親媒性の $\alpha$ または $3_{10}$ ヘリックス構造をとるようなアミノ酸配列をもつ。FauchereとPliska（1983）によるアミノ酸の疎水性に基づき、F-MuLV（Koch et al., 1983）とM-MuLV（Shinnick et al., 1981）の両方の*env* 全配列を11残基ずつにわけて両親媒性のヘリックス構造をとりやすいものを探した。2つのThクローンSB14-31、BL4L-23はMBL-2にも反応したので、さらにこの中からF-MuLVとM-MuLVに共通する配列を持つものを選びN端とC端に合計9残基をつけて20残基としたペプチドを合成し、その活性を調べた。その結果、SB14-31、BL4L-23はF-MuLVの*env*<sub>122-141</sub>（DEPLTSLTPRCNTAWNRLKL）（以降f<sub>n20</sub>と呼ぶ）によって刺激を受け、増殖することがわかった（図4）。このペプチドは、M-MuLVの同じ領域とは1残基（122番がAspではなくGlu）を除いて同じである。B6マウスはクラスII型MHCのE $\alpha$ 鎖が欠損しているため、I-Eを細胞表面に発現できないので、このペプチドはI-A<sup>b</sup>分子上に提示されているといえる。



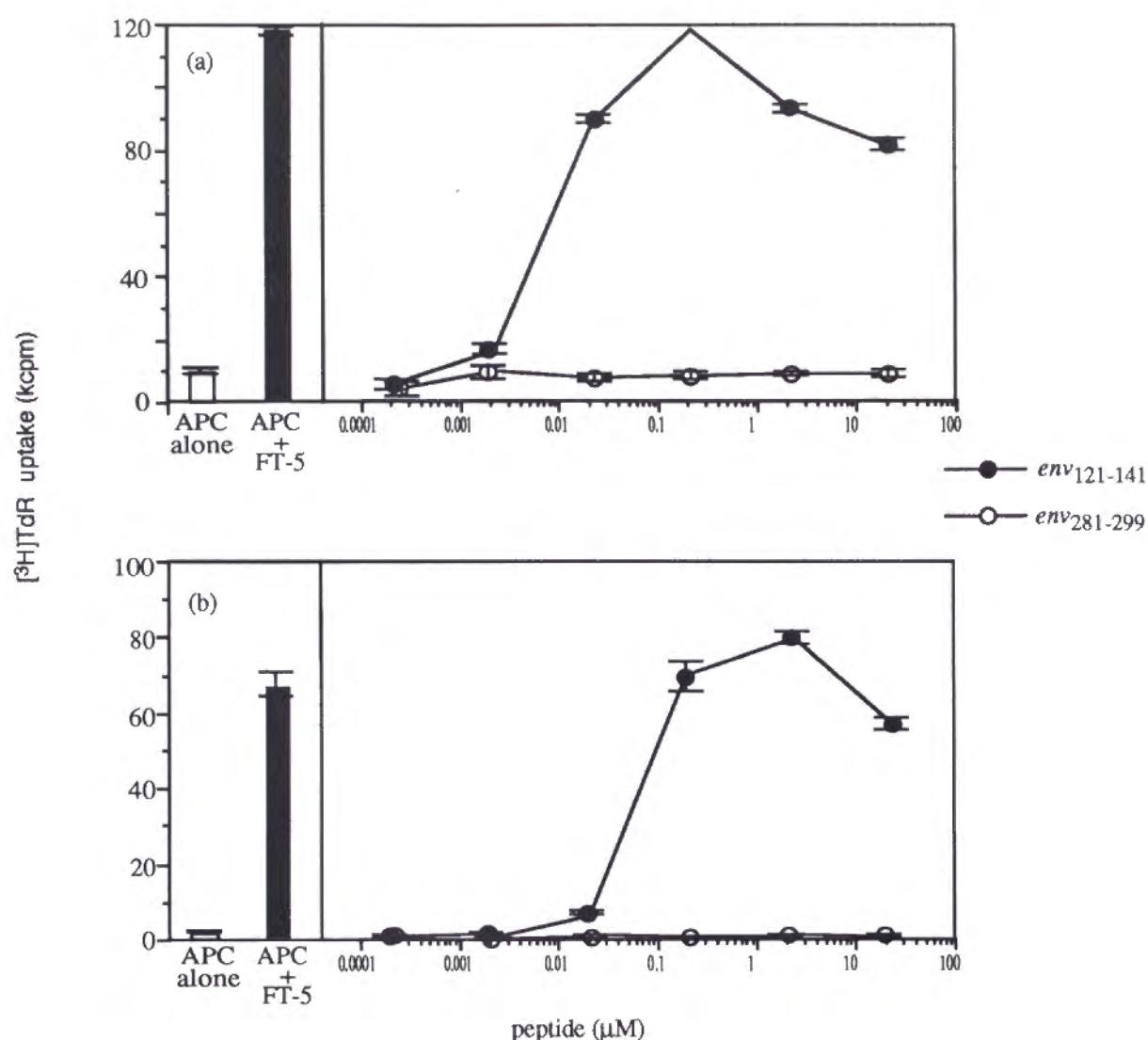


図4 合成ペプチド $env_{122-141}$ によるThクローンの増殖

同系マウスの脾臓細胞をAPCとして用いて、異なる濃度のペプチドによる増殖を<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みによって測定した。

(a) SB14-31、(b) BL4L-23

右側の棒グラフは、ポジティブコントロールとしてのFVで誘発された腫瘍細胞FT-5によるそれぞれのThクローンの増殖。

*env*<sub>281-299</sub> (LSLPRPNLPKPAKSPPAS) ペプチドは、ネガティブコントロールとして用いた。

5回の実験のうちの一例を示す。

#### 4. 合成ペプチドを用いたF5-5の抗原ペプチドの決定

Rudenskyら (1991) は、H-2<sup>b/d</sup>を持つB細胞リンパ腫LB27.4のクラスII型MHC分子上に提示されるいくつかの内在性ペプチドを報告している。内在性ウイルスAKVの *env*<sub>454-469</sub> (SPSYVYHQFERRAKYK) はI-E<sup>b/d</sup>分子に結合している。そこでF-MuLVの対応する *env*<sub>462-479</sub> (HPPSYVYSQFEKSYRHKR) を合成した。図5に示すようにこのペプチドはF5-5を活性化させた。さらにこの活性は抗MHC I-E  $\alpha$  鎖抗体14-4-4Sによって阻害される (図6)。また、FBL-3によるF5-5の増殖活性は同系 (CB6F<sub>1</sub>) マウスの脾臓細胞をAPCとして要求する (Iwashiro et al., 1993)。これらの結果から、F5-5はI-E<sup>b/d</sup>分子上に結合した*env*<sub>462-479</sub>ペプチドを認識していることがわかった。

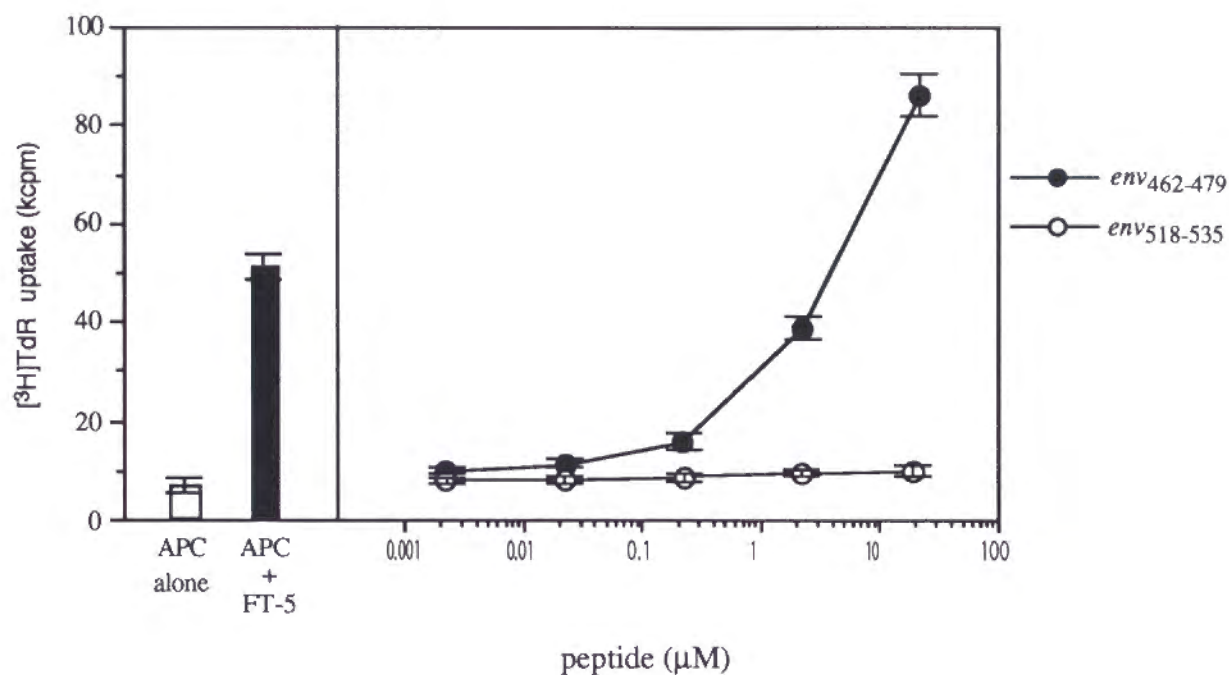


図5 合成ペプチドenv462-479によるThクローンF5-5の増殖

CB6F<sub>1</sub>マウスの脾臓細胞をAPCとして用いて、異なる濃度のペプチドによる増殖を [<sup>3</sup>H]thymidineの取り込みによって測定した。  
右側の棒グラフは、ポジティブコントロールとしてのFVで誘発された腫瘍細胞FT-5によるそれぞれのThクローンの増殖。

env518-535 (LHA AVQDDLKEVEKSITN) ペプチドは、ネガティブコントロールとして用いた。  
3回の実験のうちの一例を示す。

[<sup>3</sup>H]TdR uptake (kcpm)

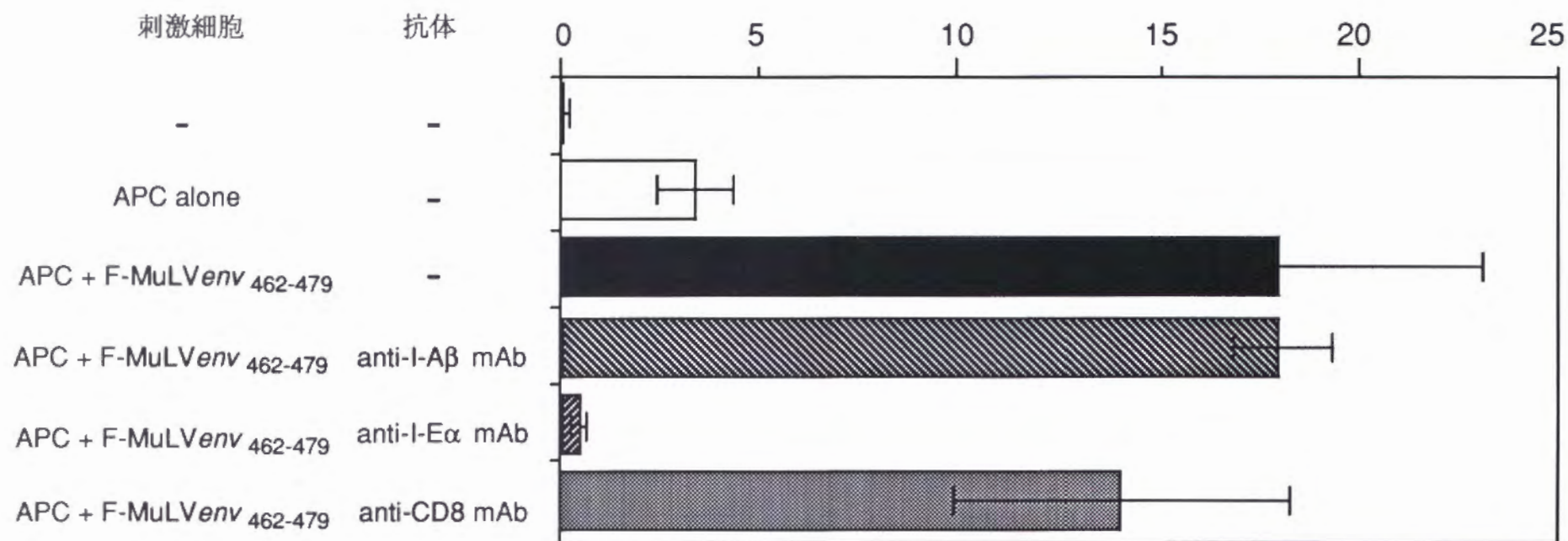


図6 抗体によるenv<sub>462-479</sub>によるF5-5の活性の阻害

CB6F<sub>1</sub>マウスの脾細胞をAPCとして用いて、21.5μMのペプチドによる増殖をMHCに対する抗体が阻害できるかを調べた。

## 5. $f_{n20}$ ペプチドを用いた免疫によるThクロンの単離

腫瘍細胞FBL-3を用いてマウスを免疫した場合、FBL-3特異的Thクロンの単離は難しかった (Iwashiro et al., 1993)。今回同定された $f_{n20}$ ペプチドは非常によくThクロンを刺激し、増殖させることができるので、より多くのThクロンを得ることを目的とし、ペプチドを用いてマウスを免疫した。10 $\mu$ gの $f_{n20}$ ペプチドで免疫することによりBP1-2、-3、BP2-6の3クロン、100 $\mu$ gを用いてBP3-7、-13の2クロンを得た。限界希釈及び継代時に用いた $f_{n20}$ ペプチドは、BP2、BP3は0.5 $\mu$ g/ml (0.21 $\mu$ M)、BP1は5 $\mu$ g/ml (2.15 $\mu$ M) である。

各Thクロンについてペプチド濃度を変えながら増殖を測定した。各クロンの反応性を比較する目安として、増殖が最大値の1/2になるのに必要なペプチドの濃度 ( $ED_{50}$ ) を表2に示す。この値を元に、7つのThクロンを3グループに分けた (表2)。グループI (SB14-31) は最も少ない量のペプチドで活性化される ( $ED_{50}$ は0.01 $\mu$ M)。他のクロンはより多くのペプチドを必要とし、グループII (BL4L-23、BP2-6) では $ED_{50}$ は0.1-0.3 $\mu$ M、グループIII (BP3-7、BP3-13) は0.9-11 $\mu$ M、グループIV (BP1-2、BP1-3) は17 $\mu$ Mであった。



グループ	Thクローン	ED <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
I	SB14-31	0.01
II	BL4L-23	0.13
	BP2-6	0.31
III	BP3-7	0.88
	BP3-13	1.1
IV	BP1-2	17
	BP1-3	17

表2 Thクロンの $f_{n20}$ に対する活性

各クロンの増殖が最大の1/2になるペプチドの濃度 (ED<sub>50</sub>) を示す。  
この値に基づき、Thクローンを4つのグループ (I~IV) に分けた。

## 6. ペプチドの長さで活性の変化

さらに活性に必須のアミノ酸残基を探るため、 $f_{n20}$ ペプチドの短縮を試みた。C端を4残基削った $f_{n16}$  ( $env_{122-137}$ )、さらにN端を3残基削った $f_{n13}$  ( $env_{125-137}$ )を合成した。各クローンの短縮ペプチドに対する反応性を図7から図13に示す。各クローンのそれぞれの実験におけるポジティブコントロール ( $f_{n20}$ ) に対する $ED_{50}$ を1として短縮ペプチドの $ED_{50}$ の比を表3に示す。短縮ペプチドの増殖活性は落ちるが、その変化はクローンによって異なっていた。BP2-6 (グループII)、BP1-2、-3 (グループIV) は、 $f_{n16}$ に対する活性が大きく低下する。 $f_{n13}$ に対しては、すべてのクローンでほとんど反応しなくなる。 $f_{n13}$ に対する反応性の低下は、グループIIが最も大きい。

この活性の低下がペプチドの長さによるものであるかを調べるため、 $f_{n13}$ の両端にアラニンが付加することにより20残基の長さにしたペプチドを合成した ( $f_{n13A7}$ )。アラニンの側鎖はメチル基であり、MHC、TCRのアミノ酸残基と積極的に結合したり、逆に結合を阻害することはないと考えられる。表3に示すように $f_{n13}$ にアラニンをつけることにより、活性が回復した。このことは、 $f_{n13}$ はMHC、TCRとの相互作用に必須なアミノ酸残基は持っているが、安定なMHC-ペプチド結合もしくはTCRによる認識のためには、20残基程度の長さが必要なことを示唆している。

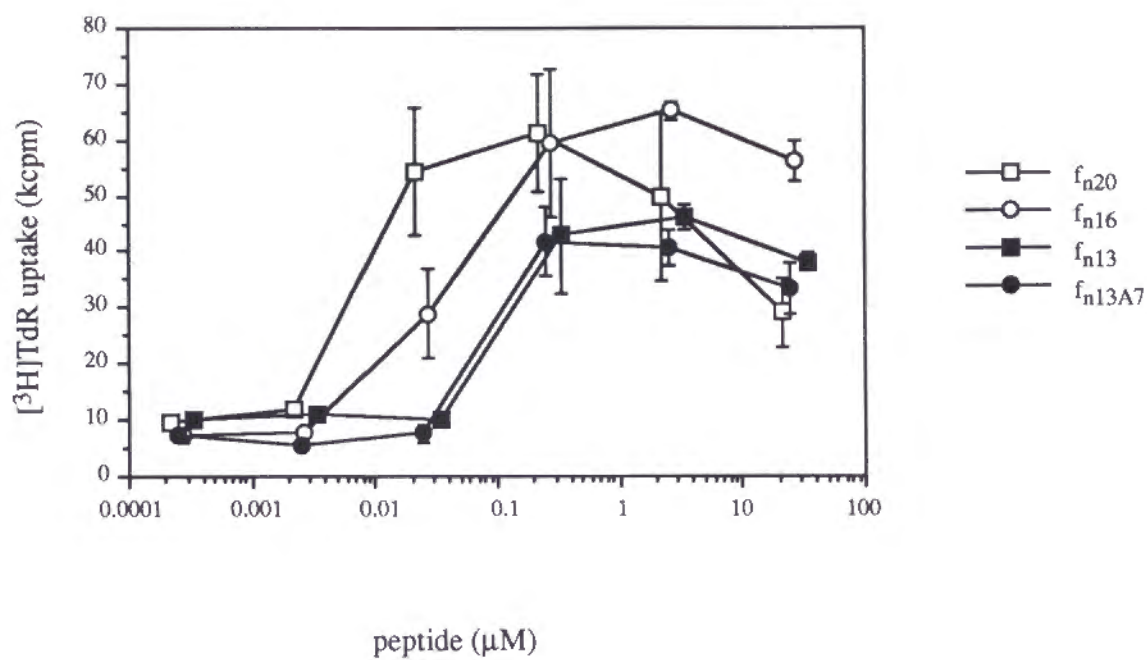


図7 ThクローンSB14-31の長さの異なるペプチドによる増殖

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みによって調べた。

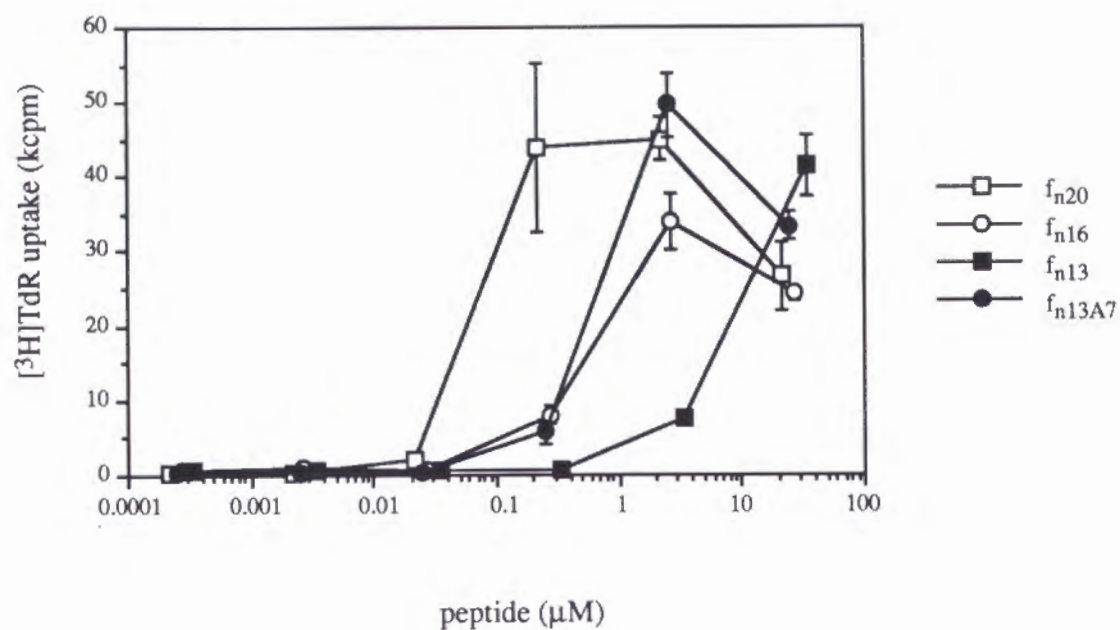


図8 ThクローンBL4L-23の長さの異なるペプチドによる増殖

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みによって調べた。

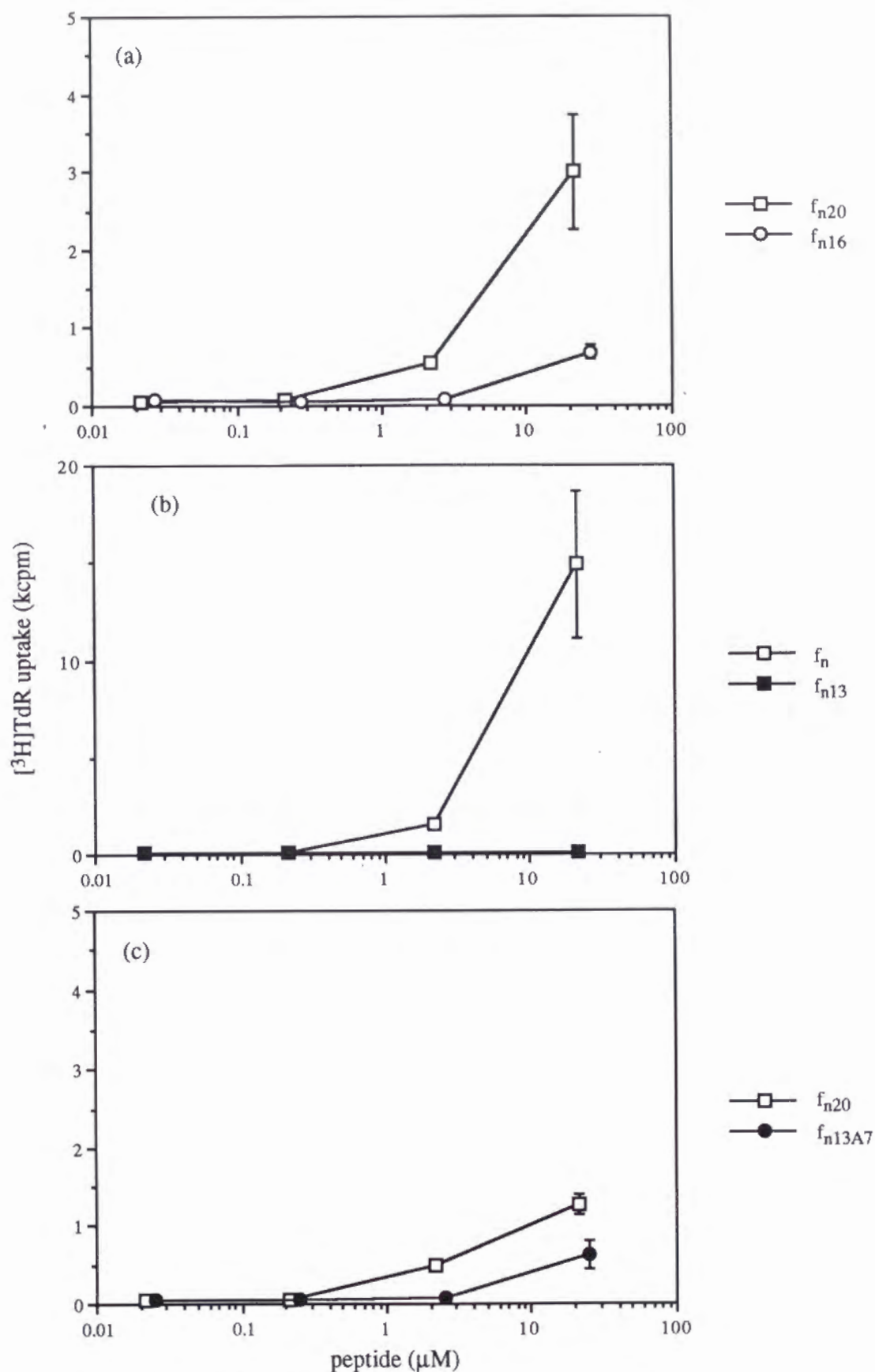


図9 ThクローンBP1-2の長さの異なるペプチドによる増殖

(a)  $f_{n16}$ 、(b)  $f_{n13}$ 、(c)  $f_{n13A7}$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]\text{thymidine}$ の取り込みによって調べた。



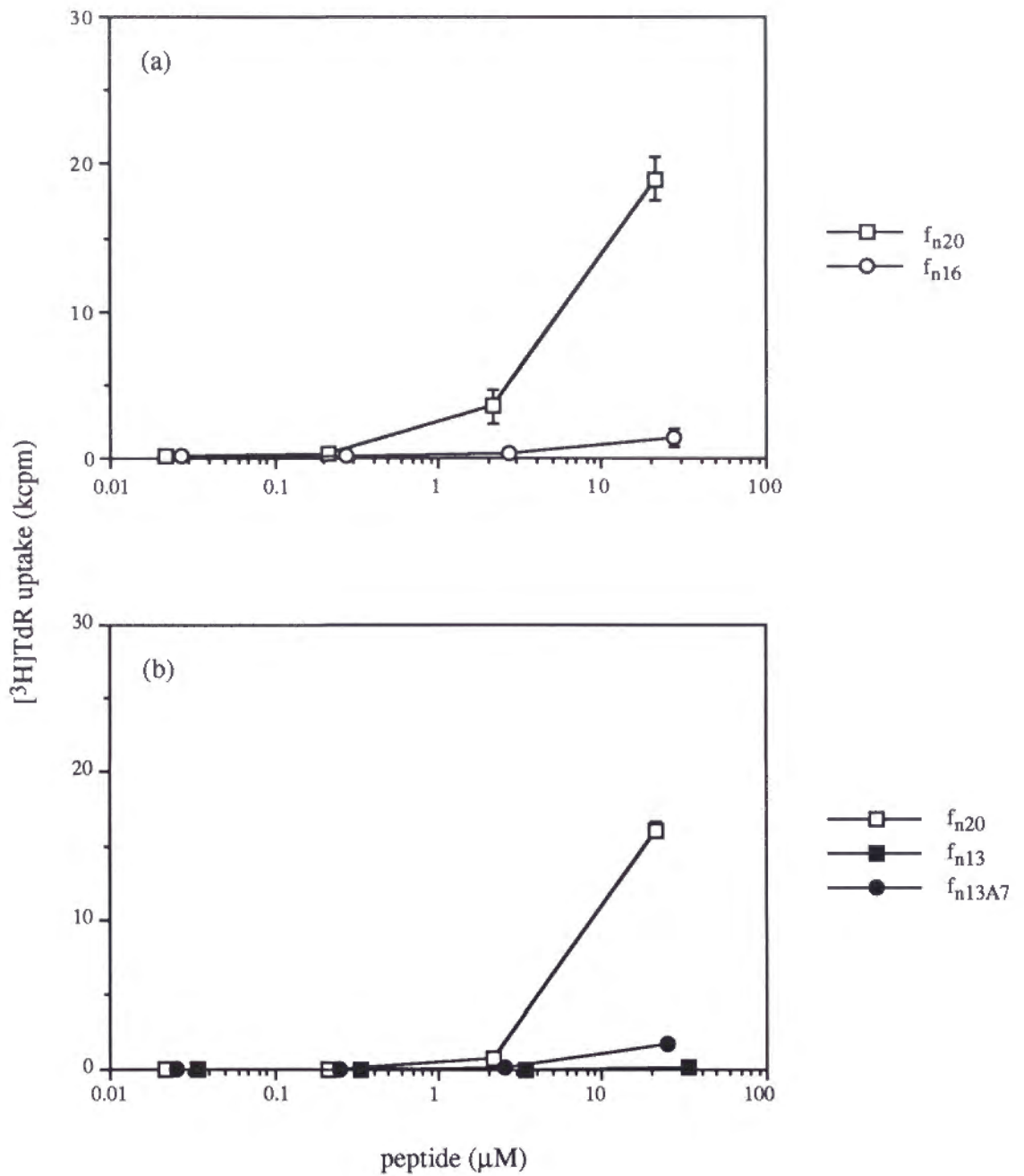


図 10 ThクローンBP1-3の長さの異なるペプチドによる増殖  
(a)  $f_{n16}$ 、(b)  $f_{n13}$ 、 $f_{n13A7}$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を  $[^3\text{H}]\text{thymidine}$  の取り込みによって調べた。

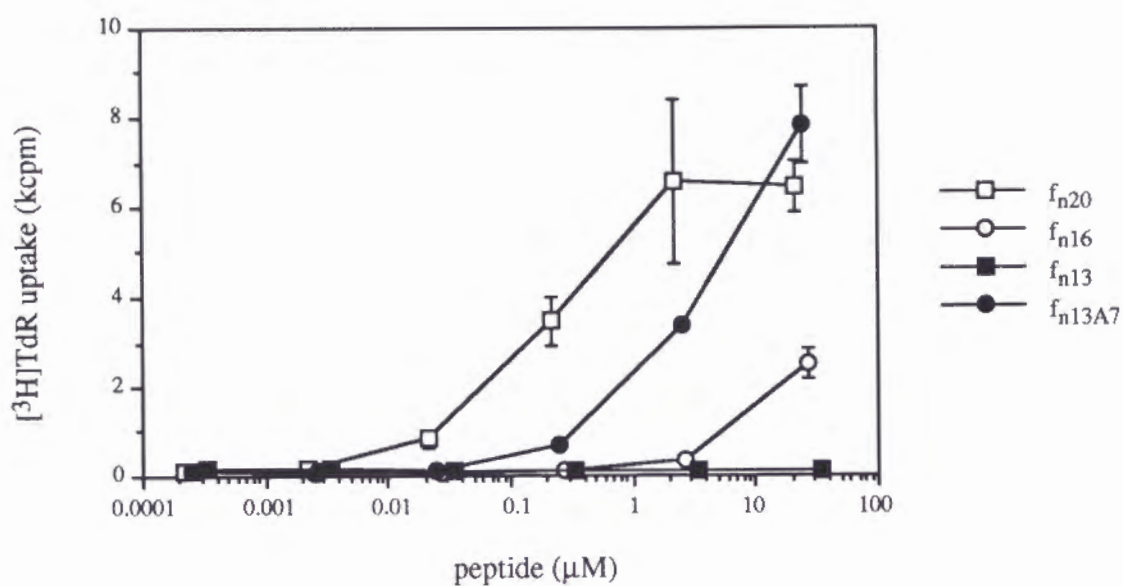


図 1 1 ThクローンBP2-6の長さの異なるペプチドによる増殖

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みによって調べた。

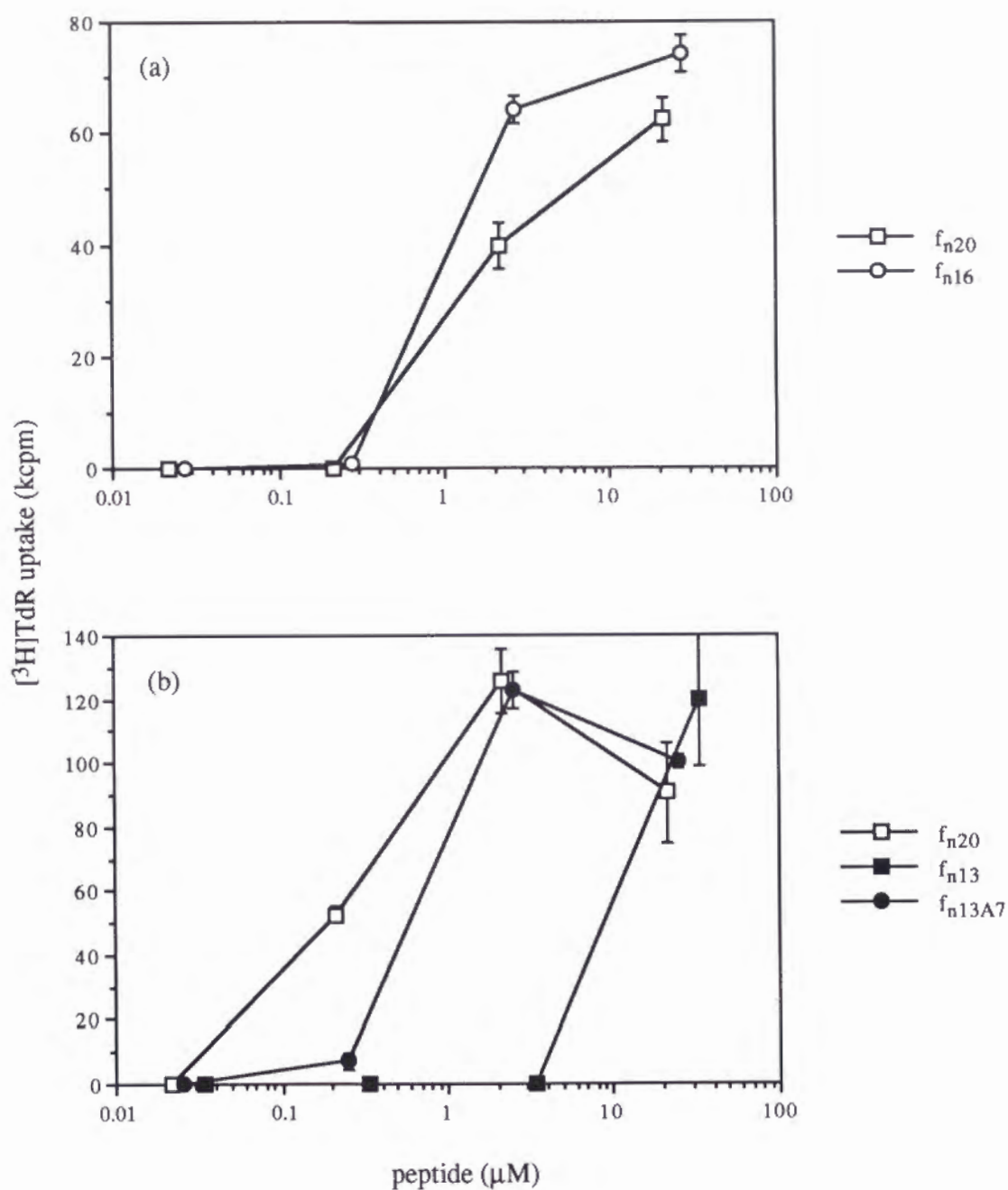


図 1 2 ThクローンBP3-7の長さの異なるペプチドによる増殖  
(a)  $f_{n16}$ 、 (b)  $f_{n13}$ 、  $f_{n13A7}$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]\text{thymidine}$ の取り込みによって調べた。

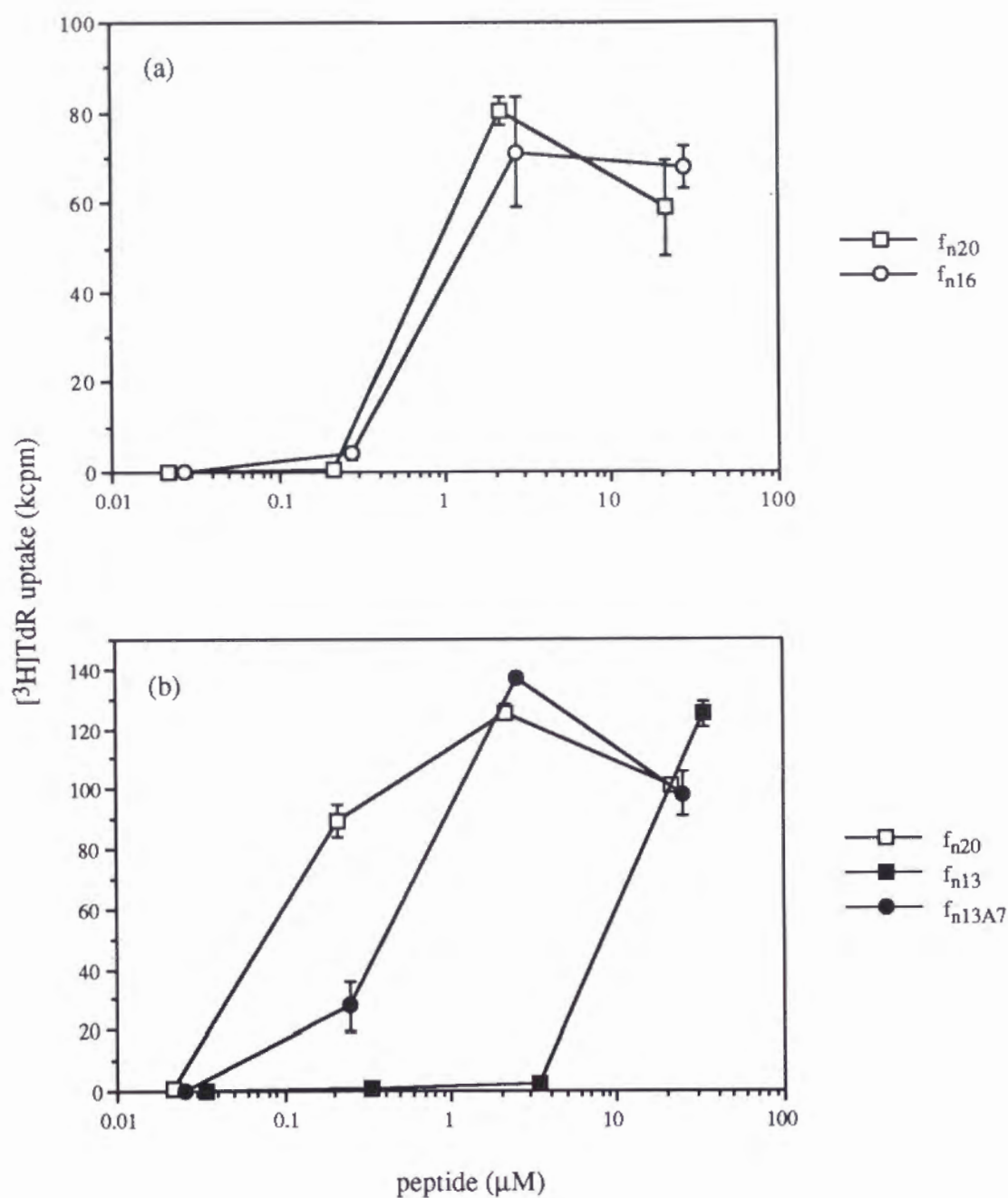


図 1 3 ThクローンBP3-13の長さの異なるペプチドによる増殖  
(a)  $f_{n16}$ 、(b)  $f_{n13}$ 、 $f_{n13A7}$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]\text{thymidine}$ の取り込みによって調べた。

ペプチド	配列	クローン						
		SB14-31(I)	BL4L-23(II)	BP2-6(II)	BP3-7(III)	BP3-13(III)	BP1-2(IV)	BP1-3(IV)
$f_{n20}$	DEPLTSLTPRCNTAWNRLKL	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
$f_{n16}$	DEPLTSLTPRCNTAWN	0.27	0.15	<0.01	0.81	0.83	0.13	0.04
$f_{n13}$	LTSLTTPRCNTAWN	0.07	0.01	<0.001	0.05	0.05	<0.04	<0.04
$f_{n13A7}$	AAALTSLTTPRCNTAWNAAAA	0.09	0.13	0.04	0.39	0.20	0.12	0.30

表3 長さの異なるペプチドに対するThクローンの反応性

各実験のそれぞれのペプチドのED<sub>50</sub>に対する $f_{n20}$ のED<sub>50</sub>の比  $\left( \frac{f_{n20} \text{のED}_{50}}{\text{各ペプチドのED}_{50}} \right)$ を表す。



## 7. アラニン置換による活性に必要なアミノ酸残基の決定

$f_{n13}$ にMHC、TCRとの相互作用に必須なアミノ酸残基が含まれていることがわかったので、次にどのアミノ酸残基が必須なのかを調べるため、 $f_{n20}$ のうち $f_{n13}$ に含まれる各残基をアラニンに置換したペプチドを合成した。各クローンのアラニン置換ペプチドに対する反応は、図14から図20に示す。これらの図に示すように、いくつかの残基の置換は $f_{n20}$ の活性を低下させた。表4に各ペプチドの7つのThクローンに対する増殖試験の結果をまとめた。Arg<sup>10</sup>、Asn<sup>12</sup>、Thr<sup>13</sup>をアラニンで置換すると( $f_4$ 、 $f_2$ 、 $f_1$ )すべてのクローンで活性が低下する。Leu<sup>7</sup>をアラニンで置換すると( $f_7$ )BP1-3以外で、Thr<sup>8</sup>をアラニンで置換すると( $f_6$ )BL4L-23以外のクローンではほとんど活性がなかった。これは、これらの5残基がThクローンの活性化に重要であることを意味する。他のアミノ酸残基の置換ペプチドは、多くのThクローンを刺激することができる。これらの残基の側鎖はMHC、TCRと結合しているのではなく、前述の5つの残基が正しい位置にあるためのいわゆるスペーサーとしての役割をしていると考えられる。

いくつかのクローンについては、この5残基以外にも反応性が変化するものがあった。BP1-2はThr<sup>5</sup>、Pro<sup>9</sup>( $f_9$ 、 $f_5$ )置換ペプチドに反応しない。BP1-3はLeu<sup>4</sup>、Cys<sup>11</sup>( $f_{10}$ 、 $f_3$ )置換ペプチドに、 $f_{n20}$ より低濃度で反応する。このことより、クローンによって同じペプチドを見る場合でも異なる認識様式をしていることがわかった。

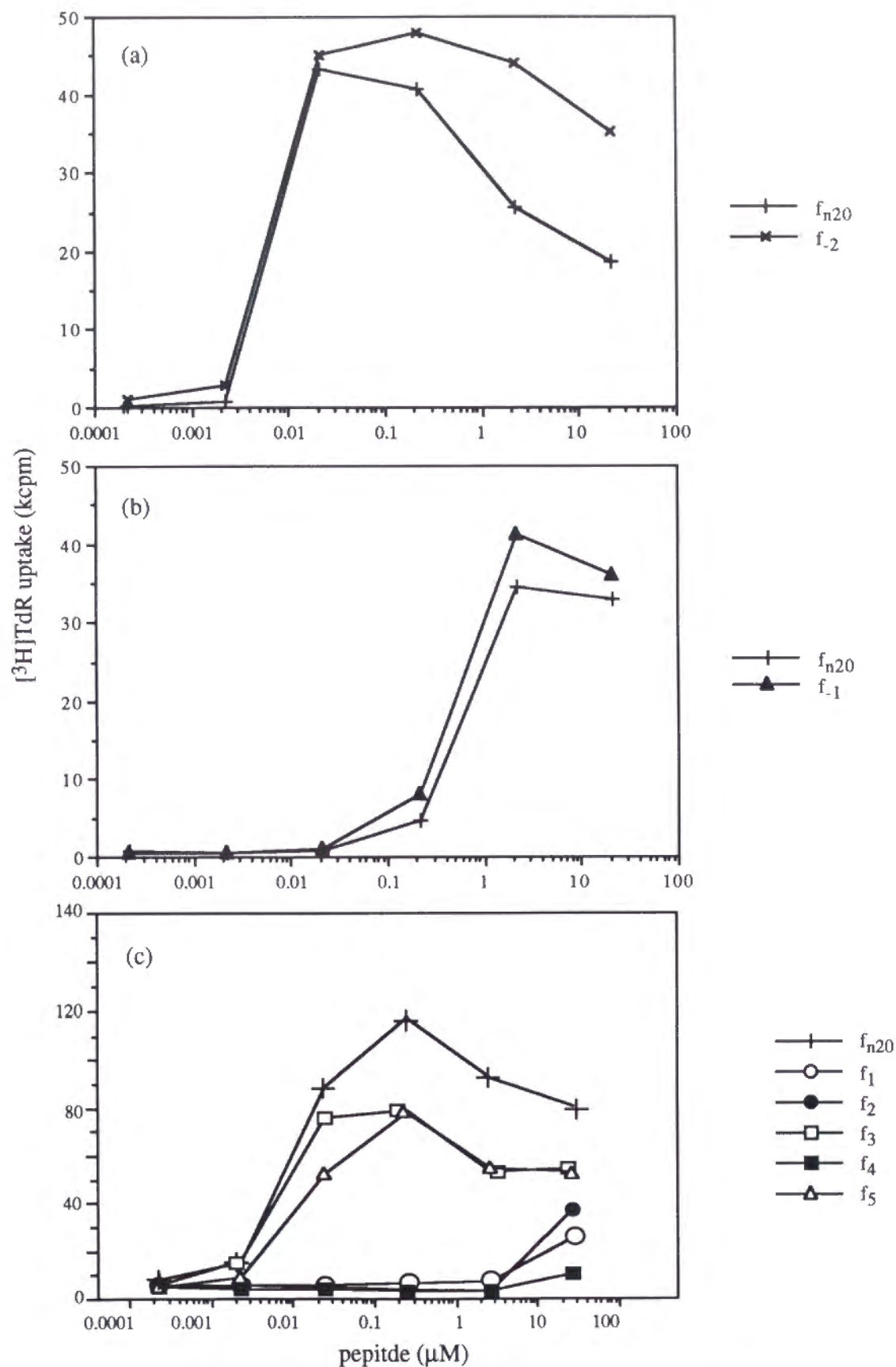


図14 ThクローンSB14-31のアラニン置換ペプチドによる増殖

(a)  $f_{-2}$ 、(b)  $f_{-1}$ 、(c)  $f_1 \sim f_5$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を  $[^3\text{H}]\text{thymidine}$  の取り込みによって調べた。

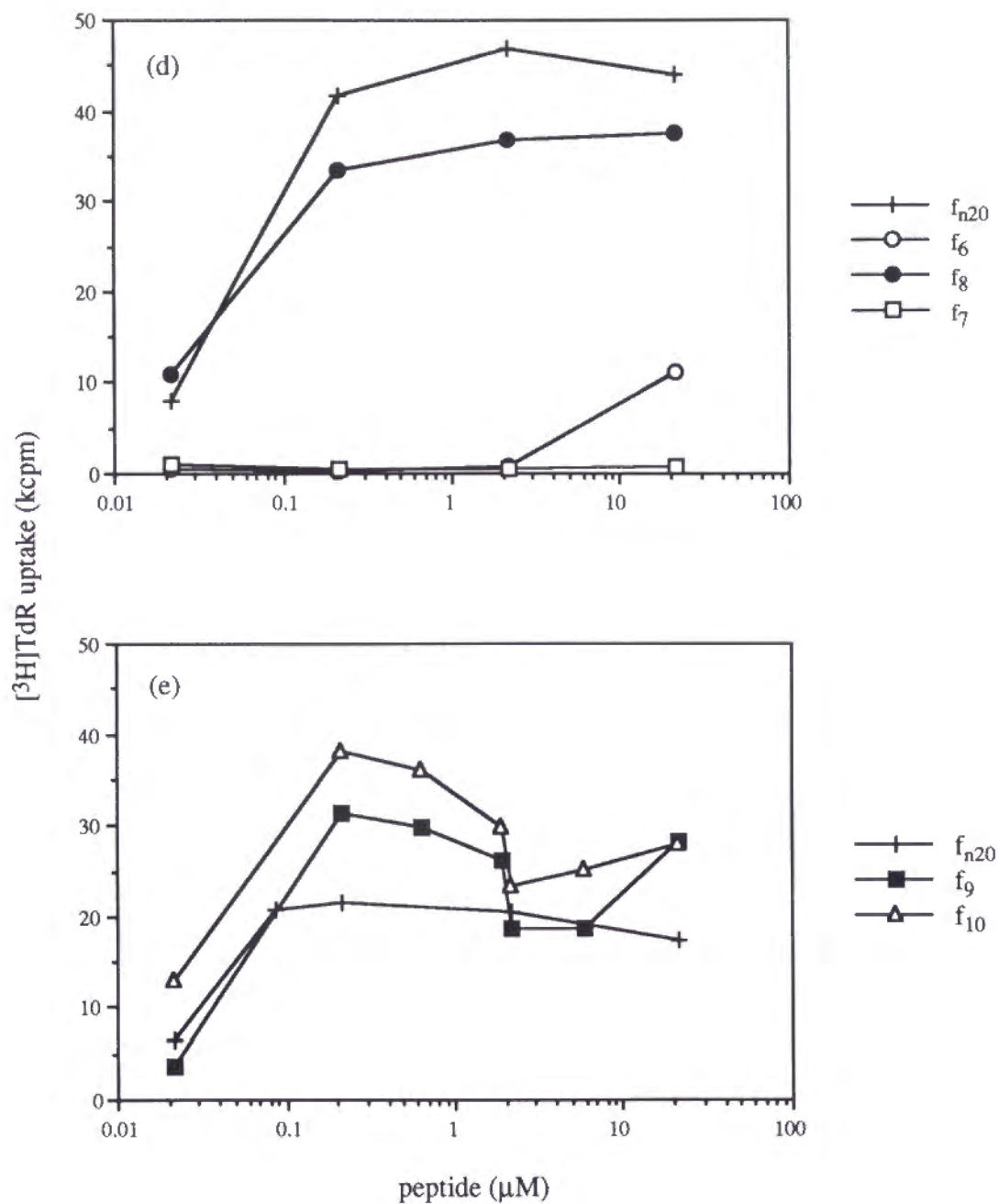


図 1 4 ThクローンSB14-31のアラニン置換ペプチドによる増殖  
(d)  $f_6 \sim f_8$ 、(e)  $f_9 \sim f_{10}$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を  $[^3\text{H}]\text{thymidine}$  の取り込みによって調べた。

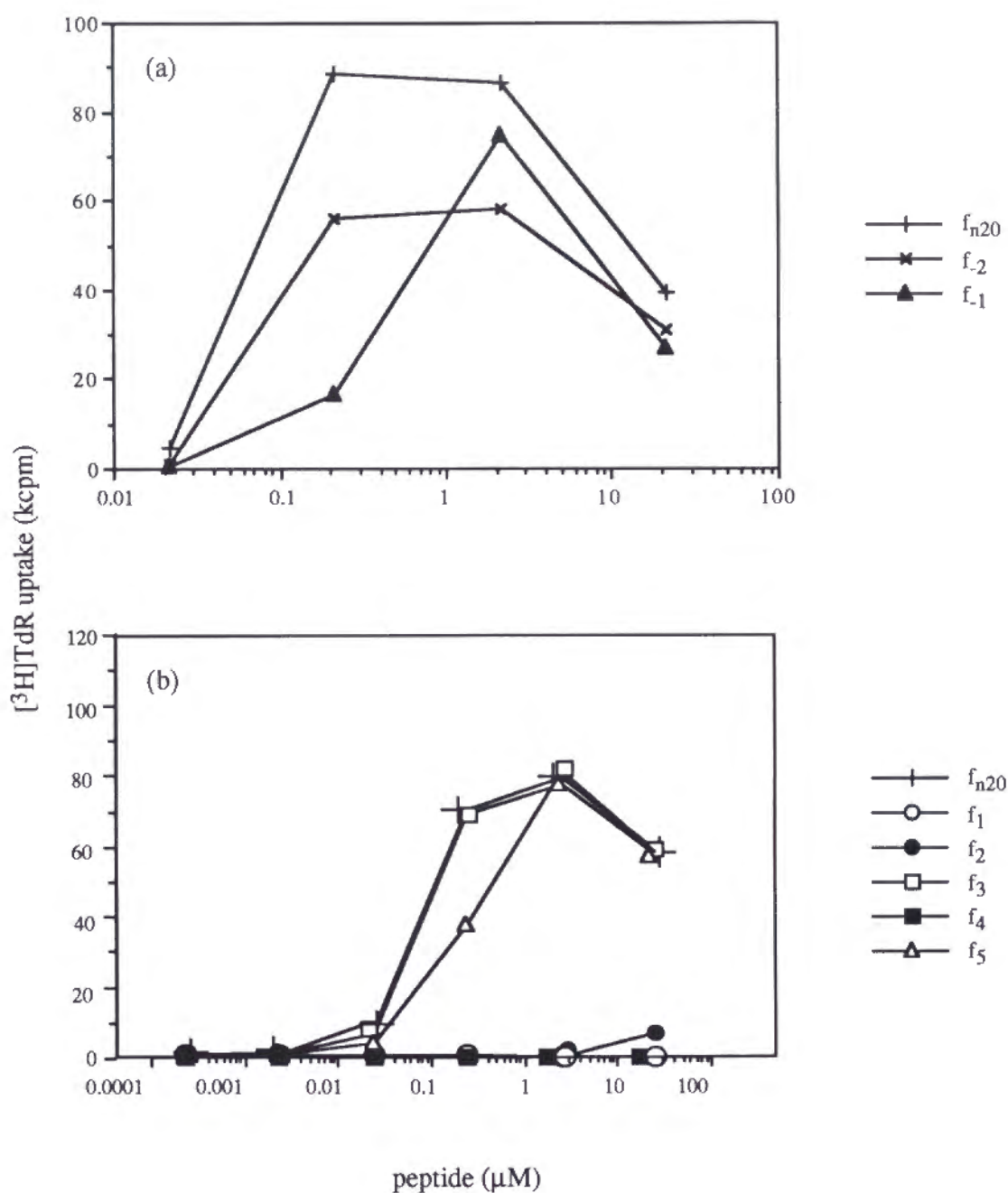


図 15 ThクローンBL4L-23のアラニン置換ペプチドによる増殖  
(a)  $f_{n20} \sim f_1$ 、(b)  $f_1 \sim f_5$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を  $[^3\text{H}]\text{thymidine}$  の取り込みによって調べた。

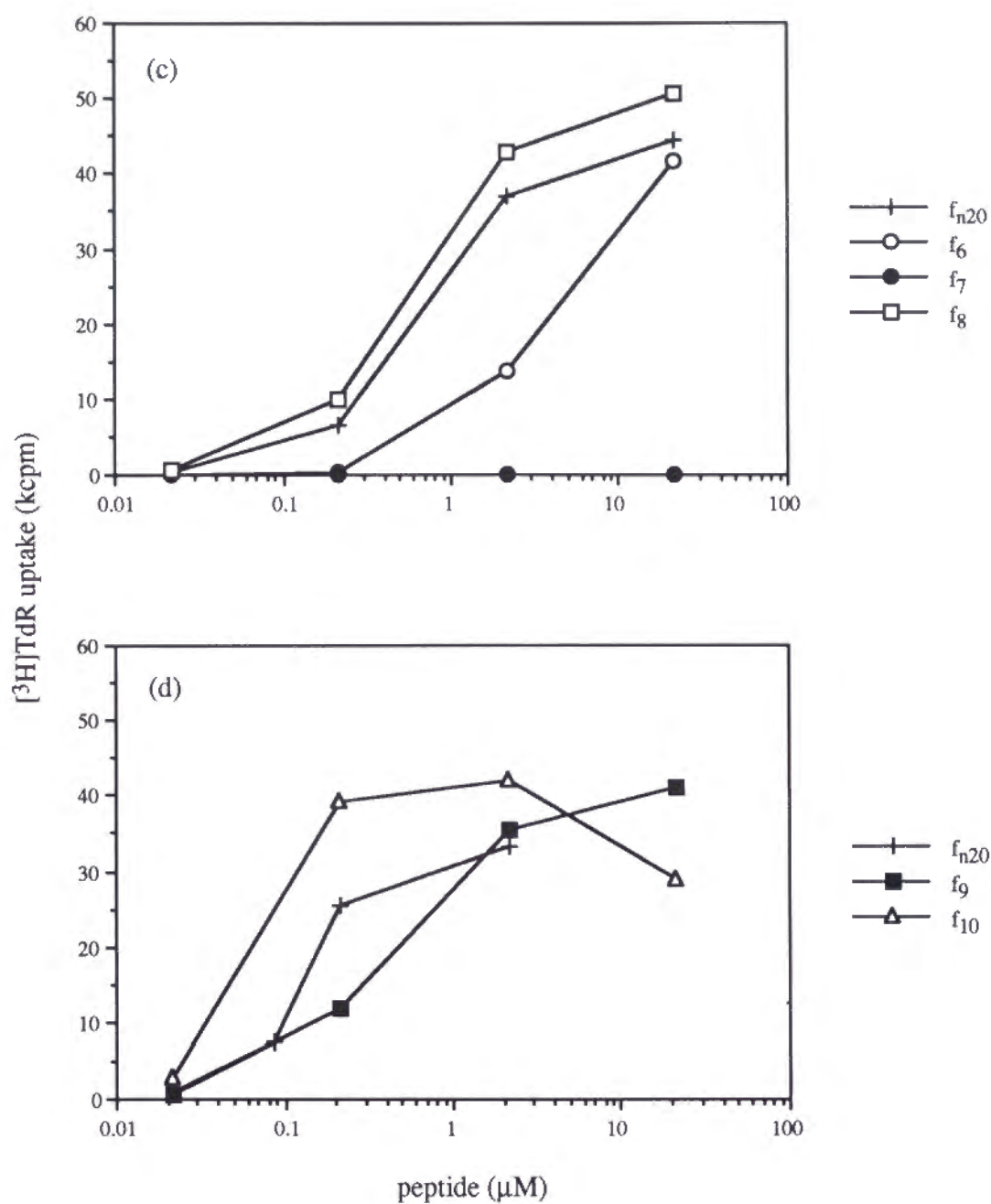


図 15 ThクローンBL4L-23のアラニン置換ペプチドによる増殖  
(c)  $f_6 \sim f_8$ , (d)  $f_9 \sim f_{10}$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]\text{thymidine}$ の取り込みによって調べた。



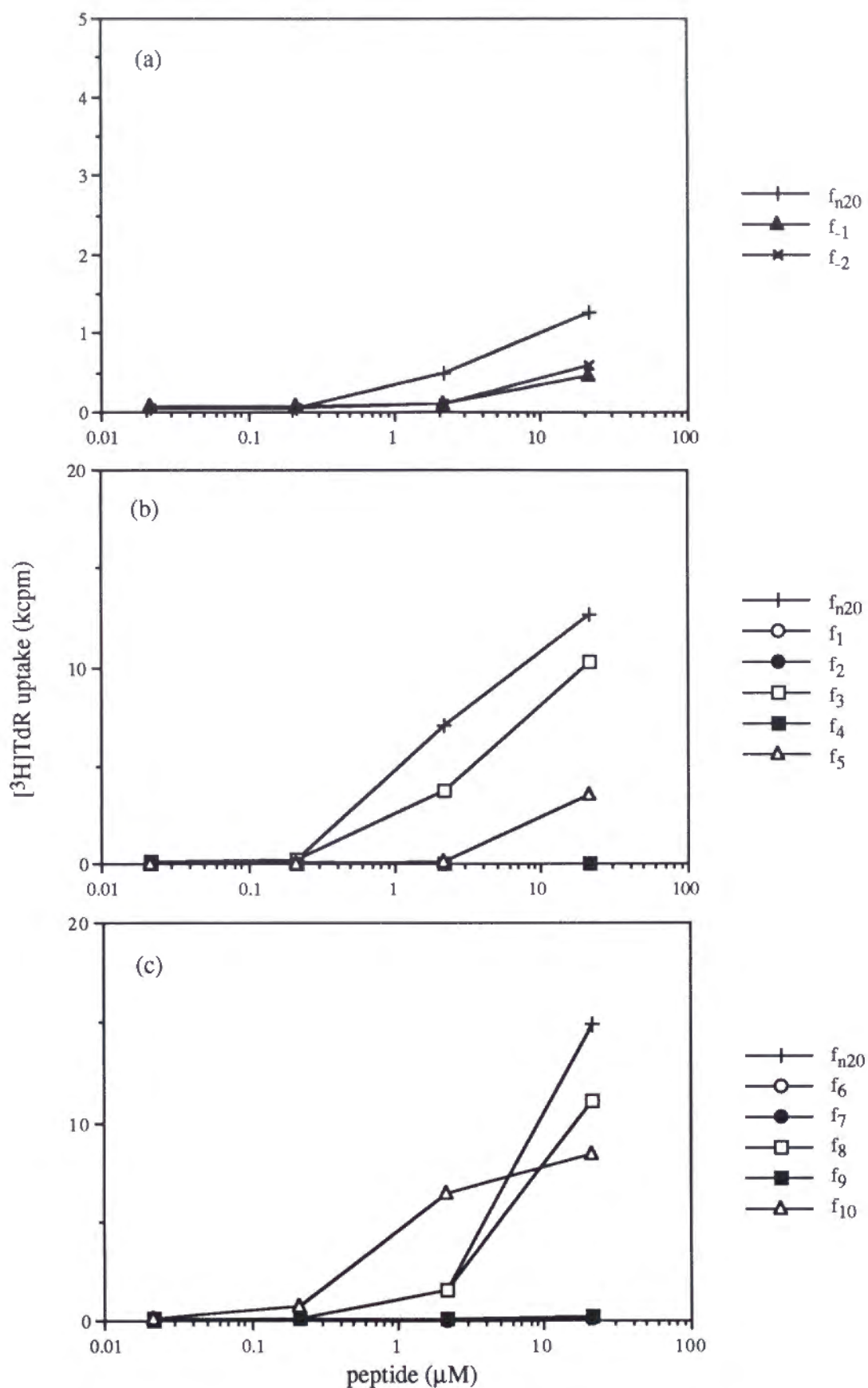


図 16 ThクローンBP1-2のアラニン置換ペプチドによる増殖

(a)  $f_{n20}$ ~ $f_1$ 、(b)  $f_1$ ~ $f_5$ 、(c)  $f_6$ ~ $f_{10}$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]\text{thymidine}$ の取り込みによって調べた。

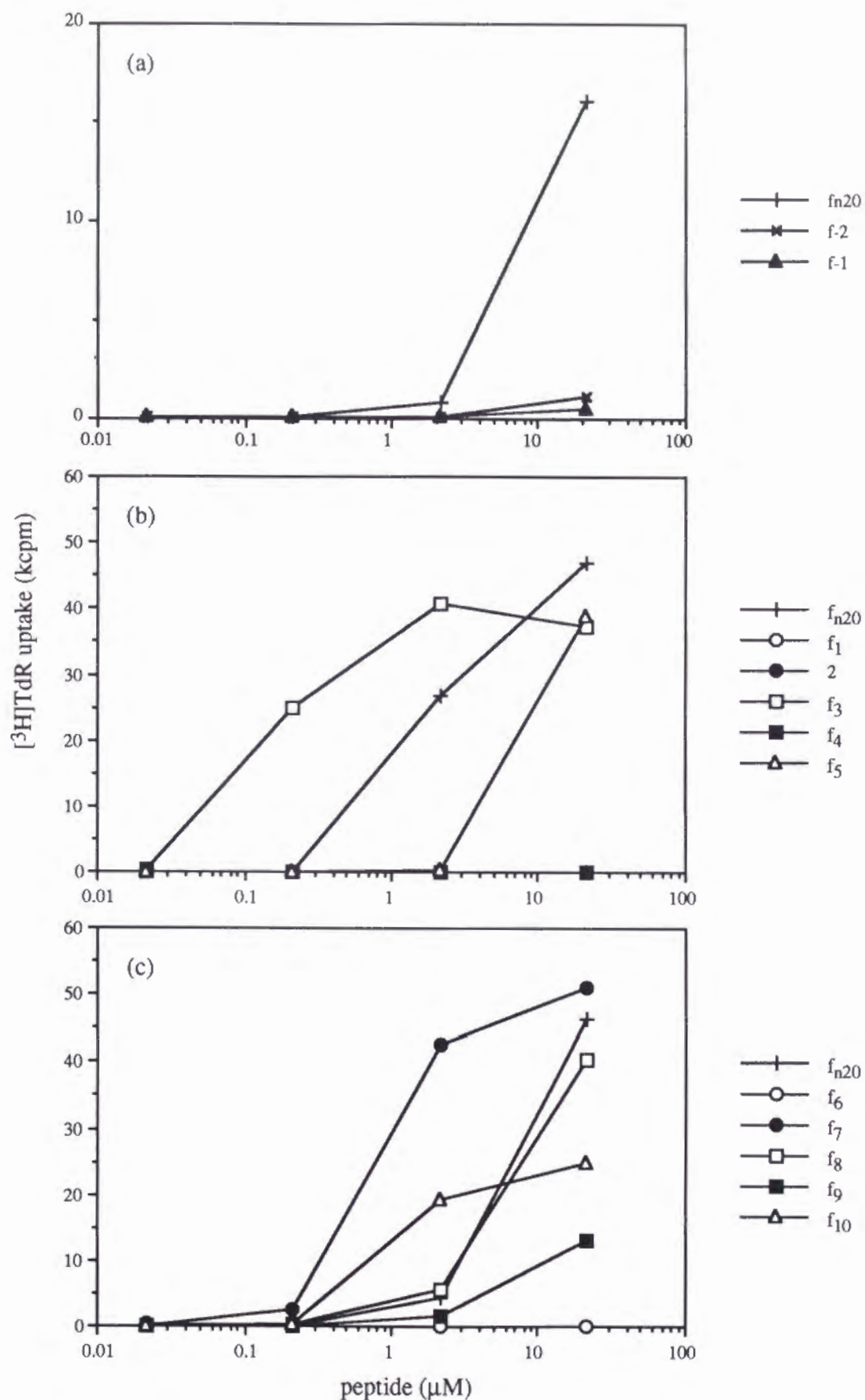


図 17 ThクローンBP1-3のアラニン置換ペプチドによる増殖

(a)  $f_{-2} \sim f_{-1}$ , (b)  $f_1 \sim f_5$ , (c)  $f_6 \sim f_{10}$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]\text{thymidine}$ の取り込みによって調べた。

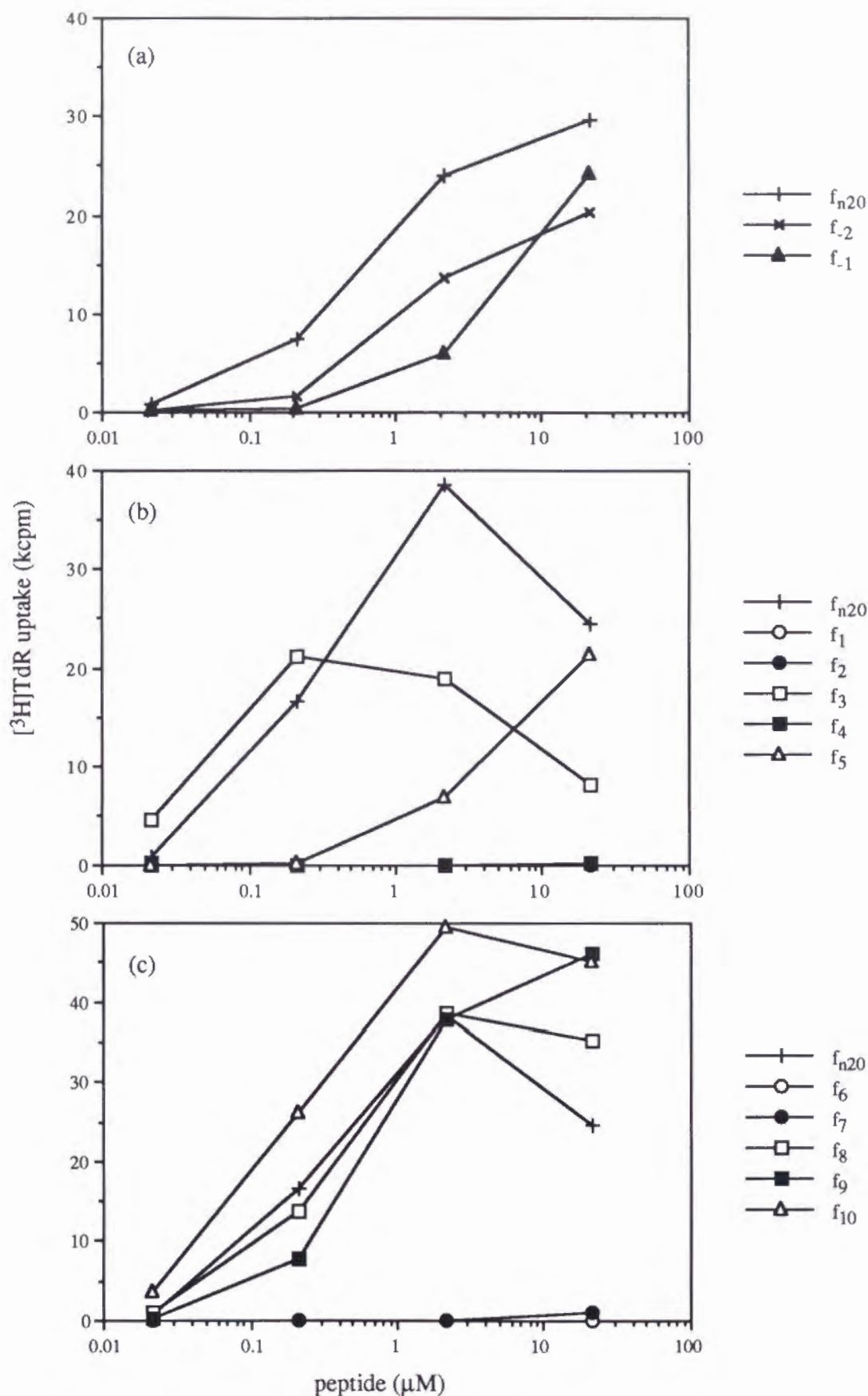


図 18 ThクローンBP2-6によるアラニン置換ペプチドの増殖

(a)  $f_2 \sim f_1$ 、(b)  $f_1 \sim f_5$ 、(c)  $f_6 \sim f_{10}$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を  $[^3\text{H}]\text{thymidine}$  の取り込みによって調べた。

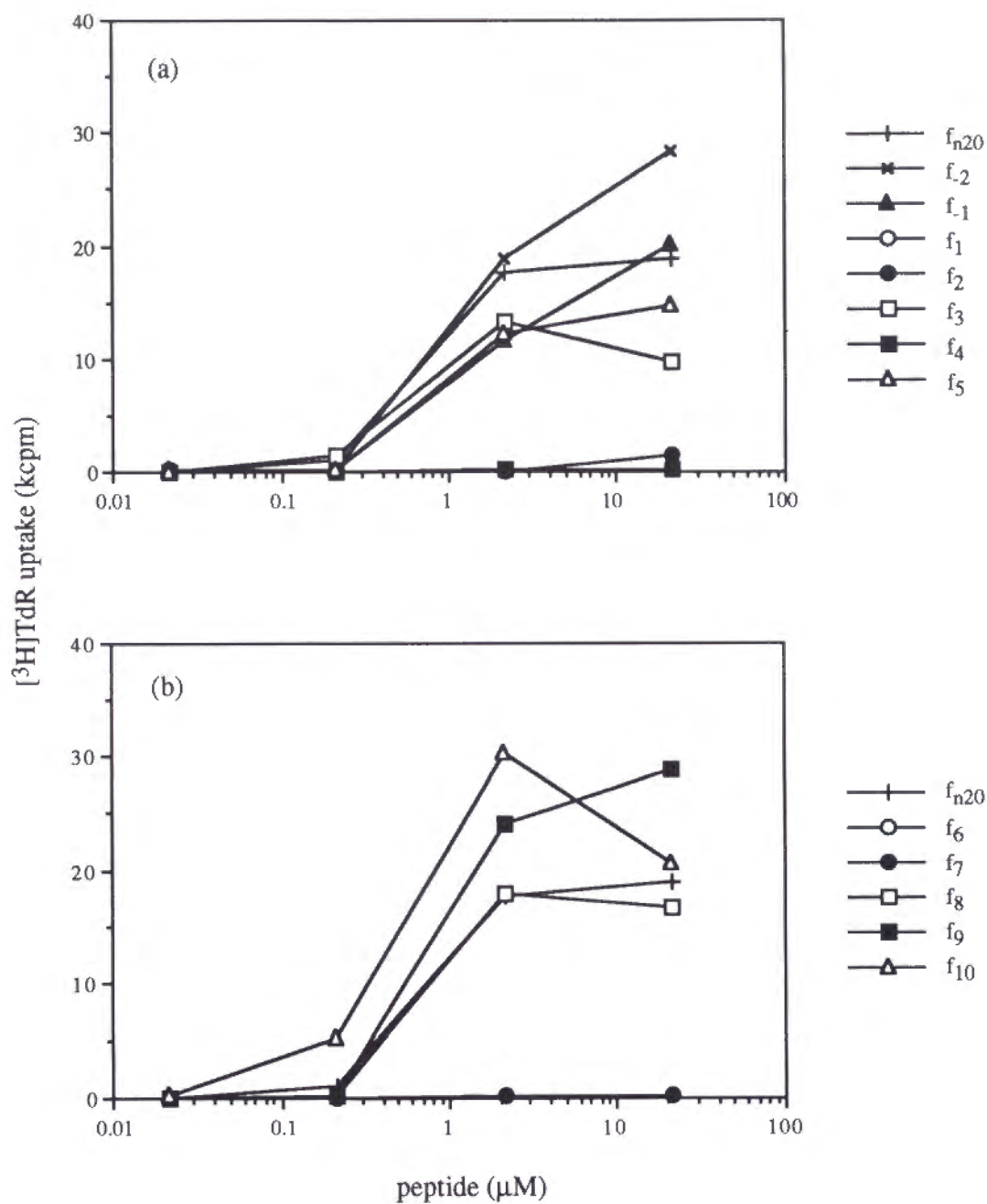


図 19 ThクローンBP3-7のアラニン置換ペプチドによる増殖  
(a)  $f_{2\sim 5}$ 、(b)  $f_{6\sim 10}$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]\text{thymidine}$ の取り込みによって調べた。

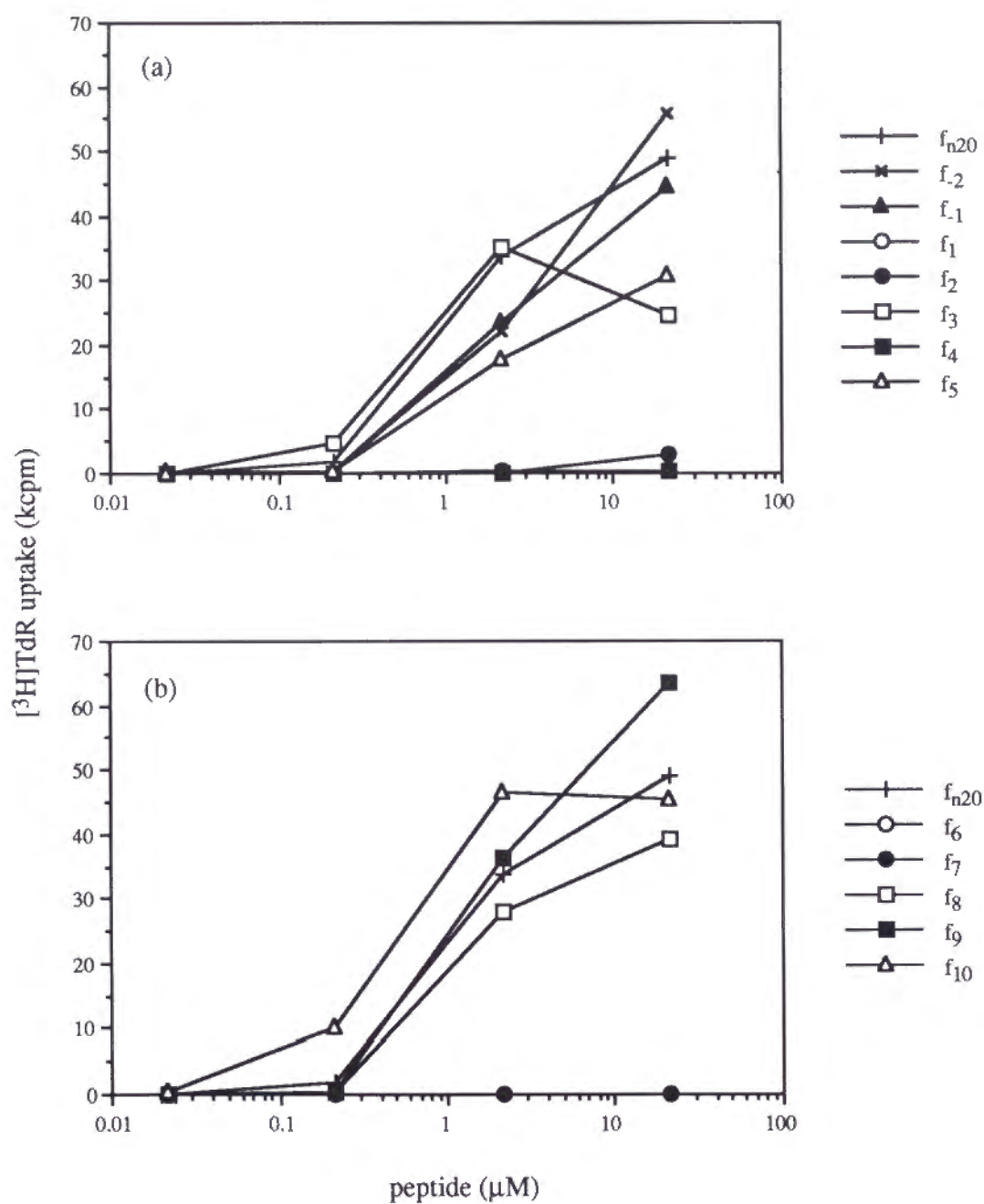


図 20 ThクローンBP3-13のアラニン置換ペプチドによる増殖  
(a)  $f_{-2} \sim f_5$ , (b)  $f_6 \sim f_{10}$

同型マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]\text{thymidine}$ の取り込みによって調べた。

ペプチド	配列	クローン						
		SB14-31(I)	BL4L-23(II)	BP2-6(II)	BP3-7(III)	BP3-13(III)	BP1-2(IV)	BP1-3(IV)
f <sub>2</sub>	-----A----	1.0	0.41	0.45	0.67	0.45	0.13	*
f <sub>1</sub>	-----A----	3.5	0.13	0.08	0.56	0.52	0.10	*
f <sub>n20</sub>	DEPLTSLTPRCNTAWNRLKL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
f <sub>1</sub>	-----A----	<0.004	-	-	-	-	-	-
f <sub>2</sub>	-----A-----	<0.004	<0.002	-	<0.02	<0.03	-	-
f <sub>3</sub>	-----A-----	1.4	1.0	4.9	1.3	1.3	0.35	16
f <sub>4</sub>	-----A-----	<0.004	-	-	<0.02	<0.03	-	-
f <sub>5</sub>	-----A-----	0.52	0.12	0.11	0.88	0.31	0.04	0.31
f <sub>6</sub>	-----A-----	<0.004	0.15	-	-	-	-	-
f <sub>7</sub>	-----A-----	-	<0.0002	<0.006	-	-	-	7.5
f <sub>8</sub>	-----A-----	1.3	1.0	0.87	1.0	0.88	0.89	1.0
f <sub>9</sub>	-----A-----	0.54	0.24	0.45	1.3	0.72	<0.03	0.12
f <sub>10</sub>	-----A-----	0.86	1.9	1.7	1.7	1.9	2.9	6.6

表4 アラニン置換ペプチドに対するThクローンの反応性

各実験の $\left(\frac{f_{n20}のED_{50}}{各ペプチドのED_{50}}\right)$ を表す。

複数回実験しているものについては、その一例を示す。

-は21.5μMでも反応しなかったことを示す。\*はf<sub>n20</sub>の反応が低くて、ED<sub>50</sub>を計算できなかった。



## 8. MHC、TCRに結合しているアミノ酸残基の決定

活性をなくした5つの置換ペプチドは $f_{n20}$ の活性を競合阻害することができるだろうか。 $f_{n20}$ を阻害できるペプチドはMHC分子に結合する能力はあるが、TCRに認識されることができないと考えられる。つまり、そこで置換されたアミノ酸残基は、TCRによって認識される残基であるといえる。 $f_{n20}$ を阻害できないペプチドはMHC分子への結合能力を失っている。つまり、それらのアミノ酸残基はMHCに結合している残基であるといえる。

最も活性の強いクローンSB14-31について、活性を失った5つのペプチド ( $f_1$ 、 $f_2$ 、 $f_4$ 、 $f_6$ 、 $f_7$ ) の競合阻害実験を行った (図2 1)。 $f_2$ 、 $f_6$ 、 $f_7$ は $f_{n20}$ を阻害したが、 $f_1$ 、 $f_4$ は阻害できなかった。このことより、Asn<sup>12</sup>、Thr<sup>8</sup>、Leu<sup>7</sup>はTCRによって認識される残基であり、Thr<sup>13</sup>、Arg<sup>10</sup>はMHCと結合している残基であるといえる。

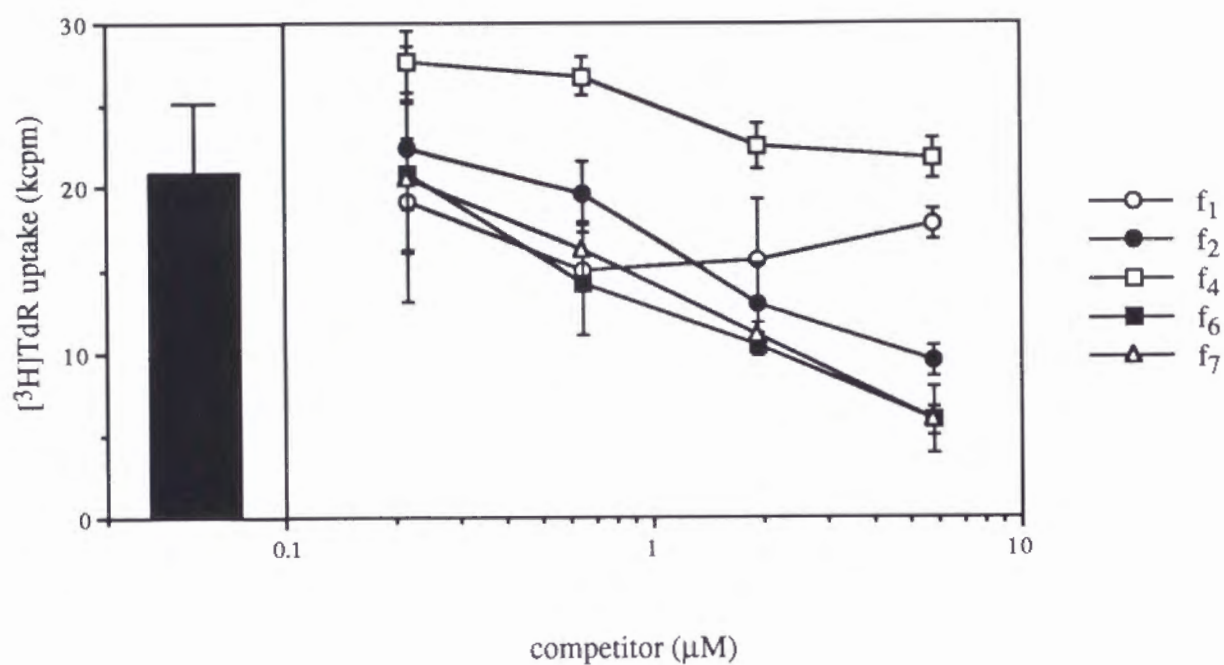


図 2 1 活性を失った置換ペプチドによる $f_{n20}$ の活性に対する競合阻害

0.08 $\mu$ Mの $f_{n20}$ によるSB14-31の増殖を、左の棒グラフで示す。  
これに対して、各ペプチドを異なる濃度で加えたときの増殖を示す。

## 9. MAPペプチドの活性

リジンの側鎖のアミノ基を利用してペプチドを8分子共有結合させた多価ペプチド抗原 (multiple antigen peptide: MAP) は、効率良く免疫を誘導できる (Tam, 1988, Posnett et al., 1988)。Defoortら (1992) は、C端に疎水性の高いtripalmitol-S-glycerylcysteinを結合させたMAPによるT細胞の活性化を観察している。そこでThクローンの活性化にMAPが有効かを調べるため、必要最小限の長さを持つ $f_{n13}$ をMAPにした $f_{n13}$ -MAP (図2.2) を合成した。そのSB14-31に対する活性は、図2.3に示すように、有意に上昇した。このことは、MAPにすることにより、ペプチドによるT細胞の活性化が増強されることを示している。

さらに活性に必須な5残基のみを持つ13残基のペプチド $f_{a13}$  (AAALTARANTAAA) およびそのMAPを合成し、そのSB14-31に対する増殖活性を調べた。図2.4に示すように、 $f_{a13}$  単独では活性は低いですが、MAPにすることにより、その活性は $f_{n20}$  と同程度にまで回復する。このことは、先の5残基がSB14-31の活性に十分であることを意味する。

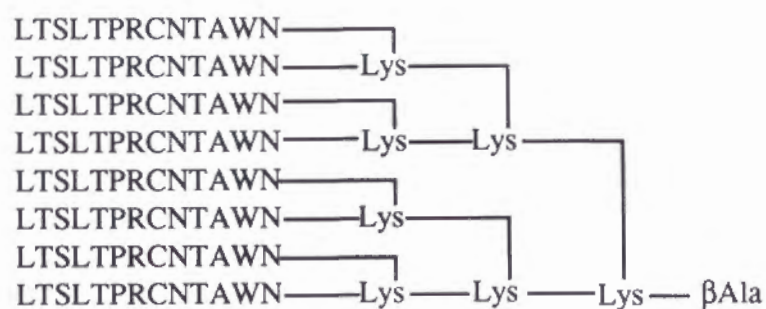


図 2 2  $f_{n13}$ -MAPの構造

β-Alaを核として、LysのN端だけでなく、側鎖のアミノ基にもペプチド鎖をつけることにより、8分子の $f_{n13}$ を結合させる。

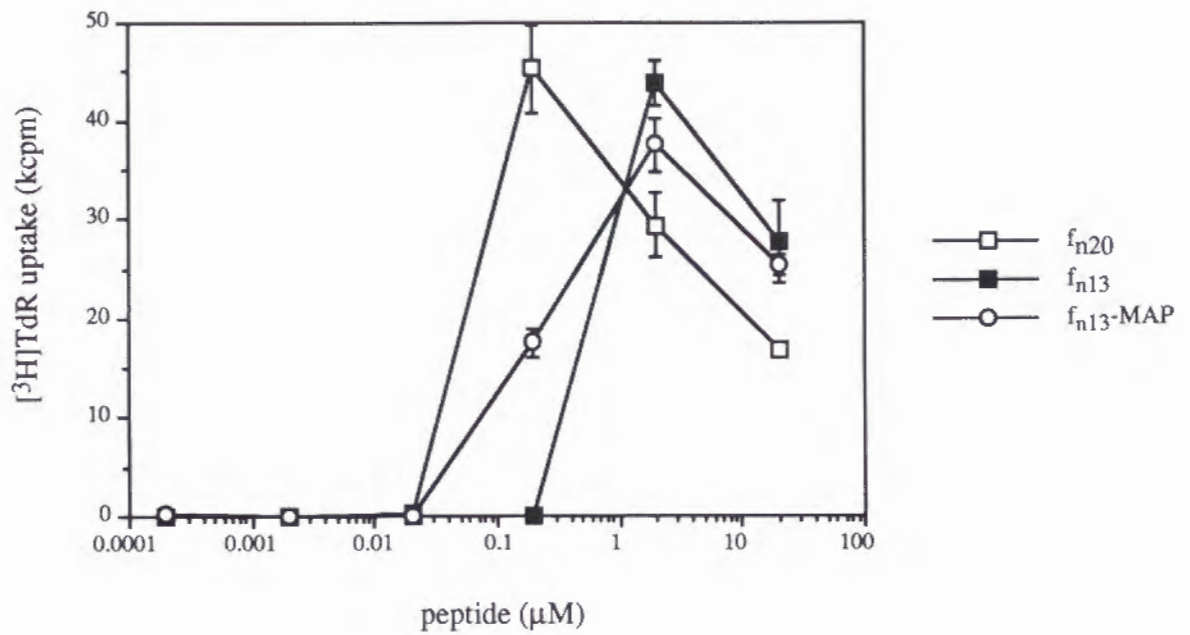


図 2 3  $f_{n13}$ -MAPによるSB14-31の増殖

同系マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みによって調べた。  
MAPペプチドの濃度は、 $f_{n13}$ の濃度に換算してある。

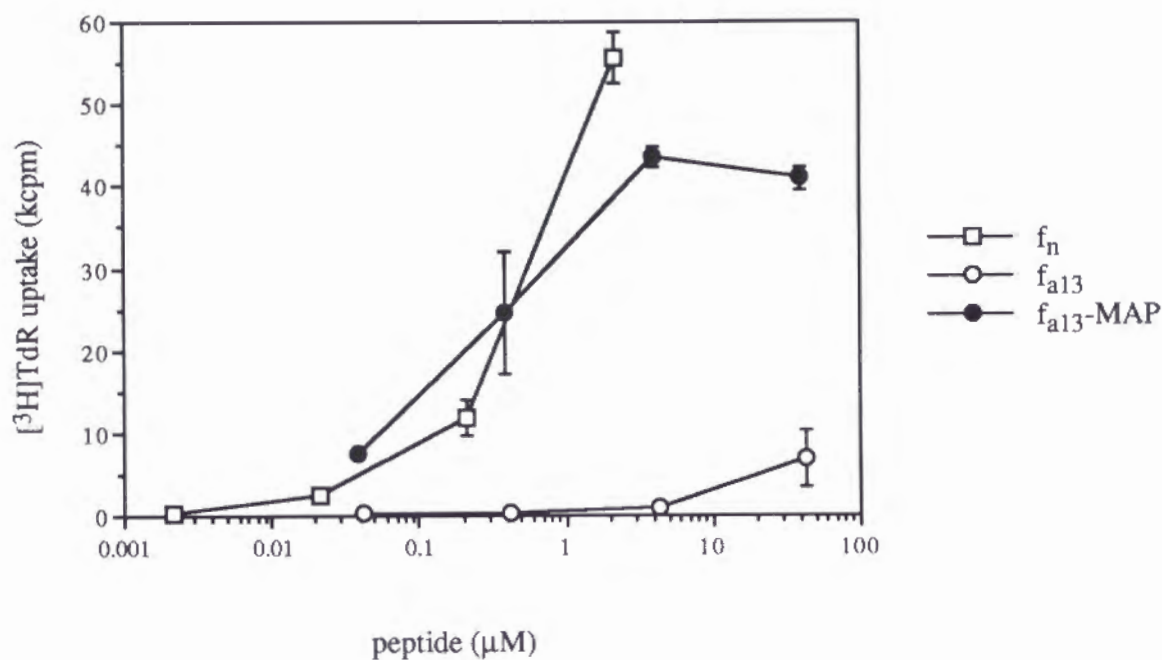


図 2 4  $f_{a13}$ -MAPによるSB14-31の増殖

同系マウスの脾臓細胞をAPCとして、異なる濃度のペプチドによる増殖を $[^3\text{H}]$ thymidineの取り込みによって調べた。

MAPペプチドの濃度は、 $f_{a13}$ の濃度に換算してある。



## 考察

### 1. FBL-3特異的Thクローンの抗原ペプチドの決定

本研究により、腫瘍細胞FBL-3特異的Thクローンの認識するペプチドとして、F-MuLVの外被蛋白gp70のN端付近とC端付近にひとつずつを同定した。N端付近の *env*<sub>122-141</sub> はMHC I-A<sup>b</sup>拘束性の下にふたつのThクローンSB14-31、BL4L-23により認識され（図4）る。C端付近の *env*<sub>462-479</sub> はI-E<sup>b/d</sup>拘束性の下にクローンF5-5によって認識される（図5、6）（Iwashiro et al., 1993）。もうひとつのクローンBL4L-30は、*env*のN端付近をI-A<sup>b</sup>拘束性の下に認識するが、その抗原ペプチドの同定には至っていない。

SB14-31、BL4L-23により認識される *env*<sub>122-141</sub> およびF5-5によって認識される *env*<sub>462-479</sub> は組換えワクシニアウイルスMR4に含まれるが（図1）、MR4感染細胞によるThの増殖は他の組換えワクシニアウイルスMR1、MR2、MR3に較べて低い（表1）。これはこのウイルスによる組換え蛋白の発現が弱いと考えられる。もしくは、この組換え蛋白は、APCによる抗原提示過程における不都合があるのかもしれない。

### 2. ペプチド免疫によるThクローンの確立

マウスをFVで誘発した腫瘍細胞FBL-3で免疫した場合、得られるT細胞は、ほとんどがCD8<sup>+</sup>を示すCTLであり、CD4<sup>+</sup>のThの頻度は1/500以下である（Iwashiro et al., 1993）。さらにCD4<sup>+</sup>のTh細胞のうちの多くが自己反応性を示す。つまり、標的とするFBL-3の存在なしで、同系マウスの脾臓細胞の存在下で増殖する。よってFBL-3特異的Thクローンの単離は、困難であった。本研究において同定されたf<sub>n20</sub> ペプチドを用いてThクローンを効率良く得ることができた。それらのクローンのうち、高い活性をもつものは、10μgのペプチドを用いてマウスを免疫し、0.5μg/ml

(0.21μM) のペプチドを含む培地で培養した時に得られた。マウスの免疫や、in vitroでのクローンの選択において、高い濃度のペプチドを用いた場合、得られたクローンの活性は低かった。図7、8、14、15に見られるように、極端に高濃度のペプチドを用いると、増殖が悪くなることがある。この傾向は、特に活性の高い

クローンの場合によくみられる。ペプチド免疫によってThクローンを得ようとする場合にも同様のことが起こり、活性の高いクローンの増殖に抑制がかかっているのかもしれない。高力価の抗体を得るために用いられる追加免疫についても、Thクローンを得るには効果が見られなかった（未発表結果）。本研究結果からペプチド免疫がThの誘導に効果があることは示唆されるが、より活性の強いThを得るにはさらに工夫が必要と思われる。

### 3. $f_{n20}$ ペプチドの各アミノ酸残基の機能

マウス生体内でクラスII型MHC I-A<sup>b</sup>に提示されるペプチドは、13 残基程度の長さを持ち、3番目のアミノ酸がアスパラギン、9番目のアミノ酸がプロリンというモチーフ構造をもつものが多い（Rudensky et al., 1992）。これら二つのアミノ酸残基がアンカーとして働き、MHC分子に結合していると考えられている。本研究で同定された $f_{n20}$  ペプチドの場合、Arg<sup>10</sup>とThr<sup>13</sup>がMHCと結合するのに重要であることがわかった。このペプチドのMHCへの結合は、典型的なモチーフ構造をもつペプチドの場合とは異なるマイナーなペプチド結合ポケットに結合していることも考えられる。鳩 cytochrome C 由来のI-A<sup>b</sup>分子に結合することが知られているペプチド（AEGFSYTDANKNKGIT）（Ogasawara et al., 1987）は、 $f_{n20}$ の活性を競合阻害することができなかった（栗林ら、未発表結果）。

クローンSB14-31の場合、Leu<sup>7</sup>、Thr<sup>8</sup>、Asn<sup>12</sup>がTCRによって認識されていることがわかった。これらMHC、TCR結合様式を図2 5にまとめた。

これら5残基のみをもつ $f_{a13}$ はほとんど活性がなかったが、MAPにした $f_{a13}$ が活性を持つ（図2 4）ことから、これら5残基がSB14-31の活性に必須であることが確かめられた。

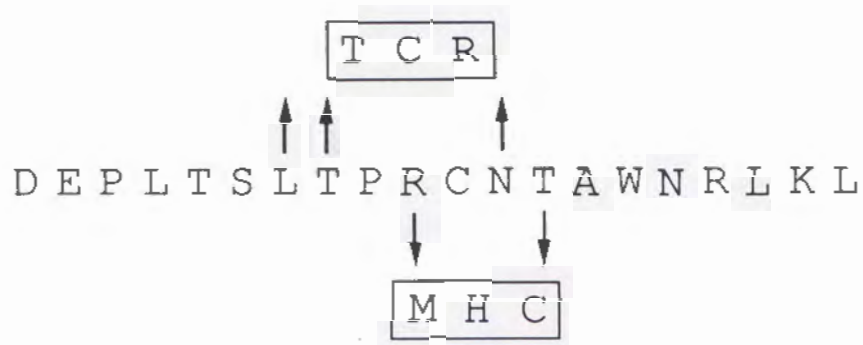


図 2 5 SB14-31の $f_{n20}$ の認識様式

Arg<sup>10</sup>、Thr<sup>13</sup>でMHCに結合し、Leu<sup>7</sup>、Thr<sup>8</sup>、Asn<sup>12</sup>でTCRに認識される。

#### 4. 同一のペプチドを認識する複数のThクローン（ペプチドの長さについて）

FBL-3によってマウスを免疫すると、得られるT細胞クローンの多くはCD8<sup>+</sup>のCTLである。そしてそのほとんどが同じTCR  $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖を発現し、同一のペプチドを認識していると考えられる（Matsubayashi, et al., 1990）。本研究でふたつのThクローンSB14-31、BL4L-23は同一のペプチドを認識していることが明らかとなったが、そのTCR  $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖は異なる（SB14-31はV $_{\alpha 4}$ J $_{\alpha 22}$ /V $_{\beta 1}$ D $_{\beta 2.5}$ 、BL4L-23はV $_{\alpha 4L-23}$ J $_{\alpha 4L-23}$ /V $_{\beta 15}$ D $_{\beta 2.1}$ ）（Iwashiro et al., 1993）。ペプチド免疫によって得られたThクローンのTCRについては現在解析が行われている。SB14-31とBL4L-23では最大増殖が得られるのに要するf $_{n20}$ の濃度に10倍程度の差が見られた。その他のクローンについては、さらに多くのペプチドを必要とした（表2）。これらの差は、TCRの親和性の違いを表わしていると思われる。

クラスII型MHCのペプチド結合部位にちょうど収まるペプチドの長さは15残基程度とされている（Brown et al., 1993）。f $_{n20}$ ペプチドは、これより長い。このペプチド結合部位からはみ出す部分がT細胞の活性化に寄与しているのかを確かめるため、N端及びC端を削ったペプチドを合成した。いずれのクローンでもペプチドの短縮により活性が低下したが、その低下の程度はクローンにより異なっていた（表3）。特にその影響はグループIIとIVで顕著に見られ、同じペプチドを認識する場合でも、TCRによって差があることが示唆された。

クラスI型MHCでは、ペプチドはN端及びC端が結合部位と結合するのでその長さは厳密に決まっている（Bouvier and Wiley, 1994）。それに対し、クラスII型MHCのペプチド結合部位はペプチドのN端及びC端がともに開いていて、ペプチドははみ出すことができる（Brown et al., 1993）。グループIからIVのクローンはf $_{n13}$ に対しては非常に低い活性しか示さなかった。ところがf $_{n13}$ にアラニンを付加して20残基に伸ばすことによって（f $_{n13A7}$ ）その活性は有意に回復した（表3）。このことはMHCのペプチド結合部位からはみ出す部分がT細胞の活性化に寄与することを示唆する。Srinivasan（1993）らによるとT細胞ハイブリドーマによって認識されるcytochrome C のペプチドは、最小で13残基で活性があるが、最大の活性は22もしくは23残基に延長したときである。クラスII型MHCに安定した形で提示されるには、Nelson（1993）らによって示唆されたようにペプチド結合部位の外におけるペプチ



ドとMHCとの結合が必要なかもしれない。

## 5. 同一のペプチドを認識する複数のThクローン（アラニン置換ペプチドについて）

クローンSB14-31のMHC、TCR結合様式は、図25に示した。しかし、アラニン置換ペプチドの各クローンにおける反応性を見たとき、これがすべてのクローンにあてはまるわけではなかった（表4）。まずクローンSB14-31で活性に必要とされていた残基でも、他のクローンでは重要性が低い残基が見られた。クローンBL4L-23の場合、Thr<sup>8</sup>を置換した場合も活性が落ちるが、他のクローンほど劇的に落ちるのではなくこの残基の重要性の低さを示している。またクローンBP1-3では、他のクローンではTCRに認識されていると考えられるLeu<sup>7</sup>をアラニンに置換すると、活性が上がる。このことは、この位置にあるロイシンの側鎖がTCRによる認識を阻害している可能性を示唆する。SB14-31ではスペーサーとして働いていた残基でも、他のクローンでは重要であるものも見られた。BP1-2におけるPro<sup>9</sup>、Thr<sup>5</sup>、BP1-3におけるThr<sup>5</sup>は重要であると考えられる。またBP1-3におけるLeu<sup>4</sup>、Cys<sup>11</sup>は、Leu<sup>7</sup>とおなじくTCRの認識にとって好ましくない。これら活性に差のある残基は、MHC結合残基（Arg<sup>10</sup>、Thr<sup>13</sup>；図25）以外であり、MHCへの結合モチーフはThクローンによる違いはないと思われる。これらの差は、各ThクローンのTCRの違いに起因していると思われる。前述のとおり、クローンSB14-31とBL4L-23ではまったく異なるTCRをもつ（Iwashiro et al., 1993）。ペプチド免疫で得られたThクローンのTCRについては現在解析中であるが、やはり異なるTCRをもっていると思われる。このように異なるTCRが同じペプチドを認識する場合において、その認識様式に相違が見られる。Thの場合、このようなTCRのペプチド認識の柔軟性により、ひとつのMHC-ペプチド複合体を複数のTCRが認識できることになる。

## 6. MAPによる活性の増強

最小の13残基を持つf<sub>n13</sub>は、活性が低い。さらに、SB14-31の活性に必須の5アミノ酸のみを持ちその他の残基をアラニンで置換したペプチドf<sub>a13</sub>は、有意ではあるが非常に低い活性を示した。これらのペプチド8分子を共有結合させたf<sub>n13</sub>-MAP、

$f_{a13}$ -MAPでは、活性が回復した（図23、24）。この活性の増強にはいくつかの理由が考えられる。ひとつは、MAPにすることによるペプチドの結合能の増加である。結合部位が1分子上に8ヶ所あるMAPは、1ヶ所だけの単体ペプチドよりもAPCの表面からはずれにくくなり、そのために低濃度のペプチドでも十分な活性を得られると思われる。また、8分子を結合させることにより、ペプチドが細胞に取り込まれ易くなるとも考えられる。もうひとつの仮説は、MAPによって多くの抗原ペプチドを連結させることによって引き起こされるMHC-ペプチド-TCR複合体の集合が、単独のMHC-ペプチド-TCR複合体よりも強いシグナルをT細胞に与えるということである。Brownら（1993）のクラスII型MHC HLA-DR1の三次元構造解析によると、クラスII型MHCは2量体になることができ、ふたつのTCRを結合させることにより、T細胞の応答を誘導することを示唆している。8分子のペプチドを共有結合させたMAPはMHC-ペプチド-TCR複合体の局所的な凝集を起こすことができ、T細胞応答を効率良く誘導できると思われる。MAPペプチドによる活性増強の仕組みについては、さらに研究する必要があると思われるが、MAPペプチドは抗体の産生に有効だけでなく、そのペプチド特異的なT細胞の誘導にも有効であるといえるだろう。

## 7. まとめ

FBL-3は、同系のH-2<sup>b</sup>マウスに移植すると、いったん腫瘍塊を形成するが、宿主の免疫系は腫瘍特異的なウイルス抗原を認識し、拒絶するので、免疫による腫瘍やウイルスの排除を解析するためのモデル系として優れている。この腫瘍拒絶の際に、多くのCTLが誘導される。これらのCTLは、F-MuLVのgagのリーダー領域のペプチドを認識することが最近わかった（Kondo et al., 論文投稿準備中）。Thの誘導は少ないが、その働きは重要である。本研究で解析されたThの抗原ペプチド $f_{n20}$ は、I-A<sup>b</sup>分子によってThに提示されるが、I-A<sup>b</sup>を持たないマウスはFVに対する抵抗性が弱いことから（Morrison et al., 1987, Miyazawa et al., 1988）、このペプチドの重要性が示唆される。さらにI-A<sup>b</sup>に3箇所の突然変異があるI-A<sup>bm12</sup>を持つマウスの脾細胞をAPCとするとこのペプチドは提示されることができない（栗林ら、未発表結果）。このことは、I-A<sup>bm12</sup>を持つB6マウスは、FVに対して感受性である（Miyazawa et al., 1992）という現象によくあう。そしてこの抗原ペプチド及びI-E<sup>b/d</sup>によって提示さ



れるenv<sub>462-479</sub>ペプチドは、in vitro でThクローンを活性化させるだけでなく、in vivoでFV感染に対する免疫を誘導できることが示された（Miyazawa et al., 論文投稿中）。これらの知見は、ペプチドワクチンによる免疫の誘導の可能性を示唆するものである。CTLによって認識されるペプチドのワクチン効果は、Sendaiウィルスの系でKast（1991）らによって示されている。近藤らによって決定されたFBL-3特異的CTLによって認識されるペプチドのワクチン効果について、及びThとCTLの抗原ペプチドを両方使った時の効果については、これから調べたい。また、MAPペプチドのin vitroでの活性の増加が示されたので、in vivoへの応用についても興味を持たれる。

より効率良く免疫を誘導するペプチドワクチンを開発するには、MHC-ペプチド-TCRの相互作用を詳しく解析することが必要である。現在までにいくつかのペプチドについてその構造が決定され、その特徴的なMHC結合モチーフ構造の存在が示唆されている。しかし、これらのモチーフ構造を用いた抗原ペプチドの決定は、必ずしも成功しているとは言えない。実際今回解析したThの抗原ペプチドについても、そのMHC結合様式は、過去に例のないものであった。FBL-3特異的T細胞の場合、クラスI型MHCに結合するCTL抗原ペプチドについても、結合モチーフにはあわなかった（Kondo et al., 論文投稿準備中）。さらにTCRによる認識様式にも、Thクローンによって違いがあることがわかった。特にThの場合、抗原ペプチドのMHCへの結合や、TCRによる抗原ペプチドの認識は、免疫グロブリンによる抗原の認識とは異なり、柔軟性のある認識の仕方をしているといえる。MHCやTCRの立体構造の解析とともに、本研究のような抗原ペプチドの解析によって、T細胞による抗原認識が解明されることが望まれる。

## 謝辞

本研究を行う上で、大変熱心にご指導していただきました山岸秀夫博士に、深く感謝いたします。栗林景容博士、岩城倫弘博士、寺村康史博士、上西博英氏には、Thの増殖実験等で、大変お世話になりました。藤井信孝博士、大高章博士、玉村啓和博士には、ペプチド合成について、ご指導いただきました。宮沢正顕博士は、組換えワクシニアウィルスの作製にご尽力いただきました。井口八郎博士には、研究室生活全般にわたり、お世話になりました。分子生物学研究室の大学院生、4回生の皆様の貴重な討論や助言に感謝いたします。ありがとうございました。

## 参考文献

- Aizawa, S., Suda, Y., Furuta, Y., Yagi, T., Takeda, N., Watanabe, N., Nagayoshi, M. and Ikawa, Y. (1990) "*Env*-derived gp55 gene of Friend spleen focus-forming virus specifically induces neoplastic proliferation of erythroid progenitor cells" *EMBO J.*, vol. 9, p. 2107-2116.
- Allen, P. M., Matsueda, G. R., Evans, R. J., Dunbar Jr., J. B., Marshall, G. R. and Unanue, E. R. (1987) "Identification of the T-cell and Ia contact residues of a T-cell antigen epitope" *Nature*, vol. 327, p. 713-715.
- Bouvier, M. and Wiley, D., C. (1994) "Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules" *Science*, vol. 265, p. 398-402.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1993) "Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1" *Nature*, vol. 364, p. 33-39.
- Chakrabarti, S., Brechling, K. and Moss, B. (1985) "Vaccinia virus expression vector: Coexpression of  $\beta$ -galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques" *Mol. Cell. Biol.* Vol. 5., p. 3403-3409.
- Chesebro, B., Miyazawa, M. and William, J. B. (1990) "Host genetic control of spontaneous and induced immunity to Friend murine retrovirus infection" *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 8, p. 477-499.
- Defoort, J-P., Nardelli, B., Huang, W., Ho, D. D. and Tam, J. P. (1992) "Macromolecular assemblage in the design of a synthetic AIDS vaccine" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 89, p. 3879-3883.
- Dryland, A., and Sheppard, R., C. (1986) "A system for solid-phase synthesis under low

pressure continuous flow conditions" J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, vol. 1986, p. 125-135.

Engelhard, V. H. (1994) "Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules" *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 12, p. 181-207.

Fauchere, J. L. and Pliska, V. (1983) "Hydrophobic parameters of amino-acid side chains from the partitioning of N-acetyl-amino-acid amides" *Eur. J. Med. Chem.* vol. 18, p. 369-375.

Fremont, D. H., Matsumura, M., Stura, E. A., Peterson, P. A. and Wilson, I. A. (1992) "Crystal structure of two viral peptide in complex with murine MHC class I H-2K<sup>b</sup>" *Science*, vol. 257, p. 919-927.

Fujimoto, S. and Yamagishi, H. (1987) "Isolation of an excision product of T-cell receptor  $\alpha$ -chain rearrangements" *Nature*, vol. 327, p. 242-243.

Guatam, A. M., Pearson, C. I., Smilek, D. E., Steinman, L. and McDevitt, H. O. (1992) "A polyaniline peptide with only five native myelin basic protein residues induces autoimmune encephalomyelitis" *J. Exp. Med.*, vol. 176, p. 605-609.

Hirama, T., Takeshita, S., Matsubayashi, Y., Iwashiro, M., Masuda, T., Kuribayashi, K., Yoshida, Y. and Yamagishi, H. (1991) "Conserved V(D)J junctional sequence of cross-reactive cytotoxic T cell receptor idotype and the effect of a single amino acid substitution" *Eur. J. Immunol.*, vol. 21, p. 483-488.

Ikawa, Y., Suda, Y., Furuta, Y., Tsukada, T., Takai, S. and Aizawa, S. (1992) "Search for genes cooperating with SFFV-gp55 transgene in Friend erythroleukemia development" In *Molecular Approaches to the Study and Treatment of Human Disease*. (edited by Yoshida, T. O. and Wilson, J. M., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam) p. 229-237.



Iwasato, T., Shimizu, A., Honjo, T. and Yamagishi, H. (1990) "Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination" *Cell*, vol. 62, p. 143-149.

Iwasato, T., Shimizu, T., Kanari, Y. and Yamagishi, H. (1993) "Molecular characterization of extrachromosomal circular DNAs from an embryonal carcinoma cell line induced to differentiate into neuron-like cells *in vitro*" *Cell Structure and Function*, vol. 18, p. 261-266.

Iwashiro, M., Kondo, T., Shimizu, T., Yamagishi, H., Takahashi, K., Matsubayashi, Y., Masuda, T., Otake, A., Fujii, N., Ishimoto, A., Miyazawa, M., Robertson, M. N., Chesebro, B. and Kuribayashi, K. (1993) "Multiplicity of virus-encoded helper T-cell epitopes expressed on FBL-3 tumor cells" *J. Virol.*, vol. 67., p4533-4542.

Jorgensen J. L., Esser, U., de St. Groth, B. F., Reay, R. A. and Davis, M. M. (1992) "Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics" *Nature*, vol. 355, p. 224-230.

Kast, W. M., Roux, L., Curren, J., Blom, H. J. J., Voordouw, A. C., Melen, R. H., Kolakofsky, D. and Melief, C. J. M. (1991) "Protection against lethal Sendai virus infection by *in vivo* priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 88, p. 2283-2287.

Koch, W., Hunsmann, G. and Friedrich, R. (1983) "Nucleotide sequence of the envelope gene of Friend Murine leukemia virus" *J. Virol.*, vol. 45., p. 1-9.

Kubo, E., Muto, M., Sado, T., Takeshita, S., Shimizu, T. and Yamagishi, H. (1992) "Novel TCR gene rearrangements and expression in radiation-induced thymic lymphomas" *J. Radiat. Res.*, vol. 33, p. 227-242.

Kunisada, T., Yamagishi, H., Ogita, Z., Kirakawa, T. and Mitsui, Y. (1985) "Appearance

of extrachromosomal circular DNAs during *in vivo* and *in vitro* ageing of mammalian cells" Mechanism of Ageing and Development vol. 29, p. 89-99.

Li, J-P., D'Andrea, A. D., Lodish, H. F. and Baltimore, D. (1990) "Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor" Nature, vol. 343, p. 762-764.

Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1992) "The three dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC" Cell, vol. 70, p. 1035-1048.

Margalit H., Spouge, J. L., Cornette, J. L., Cease, K. B., Delisi, C. and Berzofsky, J. A. (1987) "Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence" J. Immunol., vol. 138, p. 2213-2229.

Matis, L. A., Shu, S., Groves, E. S., Zinn, S., Chou, T., Kruisbeek, A. M., Rosenstein, M. and Rosenberg, S. A. (1986) "Adoptive immunotherapy of a syngeneic murine leukemia with a tumor-specific cytotoxic T cell clone and recombinant human interleukin-2: correlation with clonal IL-2 receptor expression" J. Immunol., vol. 136, p. 3496-3501.

Matsubayashi, Y., Hirama, T., Morioka, A., Iwashiro, M., Masuda, T., Takeshita, S., Yamagishi, H., Udono, H., Mieno, M., Nakayama, E., Shiku, H., Uenaka, A. and Kuribayashi, K. (1990) "Participation of a dominant cytotoxic T cell population defined by a monoclonal antibody in syngeneic anti-tumor responses" Eur. J. Immunol., vol. 20, p. 2095-2103.

Miyazawa, M., Nishio, J. and Chesebro, B. (1988) "Genetic control of T cell responsiveness to the Friend murine leukemia virus envelope antigen: Identification of class II loci of the H-2 as Immune response genes" J. Exp. Med., vol. 168, p. 1587-1605.

Miyazawa, M., Nishino, J., Wehrly, K. and Chesebro, B. (1992) "Influence of MHC



genes on spontaneous recovery from Friend retrovirus-induced leukemia" J. Immunol., vol. 148, p. 644-647.

Miyazawa, M., Fujisawa, R., Ishihara, C., Takei, Y. A., Shimizu, T., Uenishi, H., Yamagishi, H. and Kuribayashi, K. "Immunization with a single helper T cell epitope abrogates Friend virus-induced early erythroid proliferation and prevents late leukemia development" J. Exp. Med., 投稿中.

Morrison, R. P., Earl, P. L., Nishio, J., Lodmell, D. L., Moss, B. and Chesebro, B. (1987) "Different H-2 subregions influence immunization against retrovirus and immunosuppression" Nature, vol. 329, p. 729-732.

Nelson, C. A., Petzold, S. J. and Unanue, E. R. (1993) "Identification of two distinct properties of class II major histocompatibility complex-associated peptides" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, p. 1227-1231

Ogasawara, K., Maloy, W. L. and Schwartz, R. H. (1987) "Failure to find holes in the T-cell repertoire" Nature, vol. 352, p. 450-452.

Posnett, D. N., McGrath, H. and Tam, J. P. (1988) "A novel method for producing anti-peptide antibodies" J. Biol. Chem., vol. 263, p. 1719-1725.

Robertson, M. N., Spangrude, G. J., Hasenkrug, K., Perry, L., Nishio, J., Wehrly, K. and Chesebro, B. (1992) "Role and specificity of T-cell subsets in spontaneous recovery from Friend virus-induced leukemia in mice" J. Virol., vol. 66, p. 3271-3277.

Ruan, K-S and Lilly, F. (1991) "Identification of an epitope encoded in the *env* gene of Friend mulline leukemia virus recognized by anti-Friend virus cytotoxic T lymphocytes" Virology vol. 181, p. 91-100.

Rudensky, A. Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S-C., Barlow, A. and Janeway Jr, C. A.

(1991) "Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules" *Nature*, vol. 353, p. 622-627.

Rudensky, A. Y., Preston-Hurlburt, P., Al-Ramadi, B. K., Rothbard, J. and Janeway Jr, C. A. (1992) "Truncation variants of peptide isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs" *Nature*, vol. 359, p. 429-431.

Saper, M. A., Bjorkman, P. J. and Wiley, D. C. (1991) "Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution" *J. Mol. Biol.*, vol. 219, p. 277-319.

Shimizu, T., Iwasato, T. and Yamagishi, H. (1991) "Deletions of immunoglobulin C $\kappa$  region characterized by the circular excision products in mouse splenocytes" *J. Exp. Med.*, vol. 173, p. 165-1072.

Shimizu, T. and Yamagishi, H. (1992) "Biased reading frames of pre-existing D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> coding joints and preferential nucleotide insertions at V<sub>H</sub>-DJ<sub>H</sub> signal joints of excision products of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements" *EMBO J.*, vol. 11, p. 4869-4875.

Shimizu, T., Takeshita, S., Muto, M., Kubo, E., Sado, T. and Yamagishi, H. (1993a) "Mouse germline transcript of TCR  $\alpha$  joining region and temporal expression in ontogeny" *Int. Immunol.*, vol. 5, p. 155-160.

Shimizu, T., Muto, M., Kubo, E., Sado, T. and Yamagishi, H. (1993b) "Multiple pre-neoplastic events and clonal selection of radiation induced mouse thymic lymphomas shown by TCR gene rearrangements" *Leukemia Res.*, vol. 17, p. 959-965.

清水健之 (1993) "環状DNAからみたVDJ組換え" *臨床免疫*, 25巻、1665-1671 頁

- Shimizu, T., Uenishi, H., Teramura, Y., Iwashiro, M., Kuribayashi, K., Tamamura, H., Fujii, N. and Yamagishi, H. (1994) "Fine structure of a virus-encoded helper T-cell epitope expressed on FBL-3 tumor cells" *J. Virol.*, vol. 68, p. 7704-7708.
- Shinnick, T. M., Lerner, R. A., and Sutcliffe, J. G. (1981) "Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus" *Nature*, vol. 293, p. 543-548.
- Srinivasan, M., Domanico, S. Z., Kaumaya, P., T., P. and Pierce, S., K. (1993) "Peptide of 23 residues or greater are required to stimulate a high affinity class II-restricted T cell response" *Eur. J. Immunol.*, vol. 23, p. 1011-1016.
- Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1994) "Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide" *Nature* vol. 368, p. 215-221.
- Tam, J., P. (1988) "Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 85, p. 5409-5413.
- Toda, M. and Yamagishi, H. (1984) "Appearance of extrachromosomal circular DNA in lymphocytes from developing chick bursa" *Develop. Growth and Differ.* vol. 26, p. 197-204.
- Tonegawa, S. (1983) "Somatic generation of antibody diversity" *Nature*, vol. 302, p. 575-581.
- Williams, D. B., Ferguson, J., Gariepy, J., McKay, D., Teng, Y-T., Iwasaki, S. and Hozumi, N. (1993) "Characterization of the insulin A-chain major immunogenic determinant presented by MHC class II I-A<sup>b</sup> molecules" *J. Immunol.*, vol. 151, p. 3627-3637.

Yamagishi, H., Kunisada, T., Iwakura, Y., Nishimune, Y., Ogiso, Y. and Matsushiro, A. (1983) "Emergence of the extrachromosomal circular DNA complexes as one of the earliest signals of cellular differentiation in the early development of mouse embryo" *Develop. Growth and Differ.* vol. 25, p. 563-569.

Yamagishi, H., Kunisada, T., Toda, M., Ohnishi, N., Fujiki, H. and Sekiguchi, T. (1984) "Tumor promoters may induce the appearance of extrachromosomal circular DNAs in rodent cell lines" *Biomed. Res.* vol. 5, p. 405-412.

Zhang, W., Young, A. C. M., Imarai, M., Nathenson, S. G. and Sacchettini, J. C. (1992) "Crystal structure of the major histocompatibility complex class I H-2K<sup>b</sup> molecule containing a single viral peptide: Implications for peptide binding and T-cell receptor recognition" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 89, p. 8403-8407.